



Facultad de Ciencias
Departamento de Biología

Amaurosis Congénita de Leber y
Retinosis Pigmentaria de Inicio Precoz:
estudio clínico y genético.

TESIS DOCTORAL

Elena Vallespín García
Fundación Jiménez Díaz – CIBERER
Madrid, 2008

La Doctora Carmen Ayuso, Jefa Asociada del Servicio de Genética de la Fundación Jiménez Díaz,

CERTIFICA:

Que la presente Memoria titulada: “*Amaurosis Congénita de Leber y Retinosis Pigmentaria de Inicio Precoz: estudio clínico y genético*”, que presenta Dña. Elena Vallespín García para obtener el Grado de Doctor, ha sido realizada bajo mi dirección, autorizándola para su presentación al Tribunal Calificador.

Madrid, 15 de enero de 2008

VºBº

Fdo. Dra. Carmen Ayuso García
Directora de la Tesis Doctoral

Fdo. Prof. Dr. José Fernández Piqueras
Tutor de la Tesis Doctoral

“Si consigo ver más lejos es
porque he conseguido auparme
a hombros de gigantes”

Bernard de Chartres (siglo XII)

A mis padres,
a mi hermana,
a Simona,
a vosotros os dedico esta tesis.



“San Matteo y el ángel”
Michelangelo Merisi da Caravaggio, 1601

ÍNDICE

Índice

<u>Agradecimientos</u>	<u>XIII</u>
<u>Prólogo</u>	<u>XIX</u>
<u>Clave de abreviaturas</u>	<u>XXII</u>
1. <u>Introducción</u>	<u>2</u>
1.1. Breve descripción de la anatomía y fisiología de la retina	3
1.2. Aspectos clínicos y genéticos de las distrofias hereditarias de retina	9
1.2.1. Aspectos oftalmológicos de la RP	9
1.2.1.1. Síntomas	9
1.2.1.2. Pruebas clínicas más relevantes	11
1.2.2. Aspectos genéticos de la Retinosis Pigmentaria	13
1.2.2.1. La LCA y la RP-IP	13
1.3. Genes analizados en este trabajo	16
1.3.1. <i>Aryl hydrocarbon receptor-interacting protein-like 1 (AIPL1)</i>	16
1.3.2. <i>Centrosomal Protein, 290-KD (CEP290)</i>	17
1.3.3. <i>Crumbs, Drosophila, Homolog of, 1 (CRB1)</i>	18
1.3.4. <i>Cone-rod homeobox-containing gene (CRX)</i>	22
1.3.5. <i>Guanylate Cyclase 2D, Membrane (GUCY2D)</i>	23
1.3.6. <i>Retinol Dehydrogenase 12 (RDH12)</i>	24
1.3.7. <i>Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator-Interacting Protein (RPGRIP1)</i>	25
1.4. Futuro de la RP	27
1.5. Ventajas y aplicaciones del estudio genético en LCA y RP-IP	29
2. <u>Objetivos</u>	<u>31</u>
2.1. Objetivo general	32
2.2. Objetivos específicos	32
3. <u>Pacientes y métodos</u>	<u>34</u>
3.1. Pacientes	35

3.1.1. Criterio de inclusión	35
3.1.1.1. Criterio clínico	35
3.1.1.2. Criterio genético	35
3.1.1.3. Consentimiento informado	35
3.1.2. Número de familias estudiadas	37
3.1.2.1. 49 familias LCA	37
3.1.2.2. 128 familias RP-IP	41
3.1.3. Individuos control	48
3.2. Métodos	49
3.2.1. Protocolo de actuación	49
3.2.2. Técnicas moleculares empleadas	49
3.2.2.1. Extracción de ADN	49
3.2.2.2. Método Directo	49
3.2.2.2.1. Microarray LCA	49
3.2.2.2.2. PCR convencional: cebadores y condiciones	51
3.2.2.2.3. Análisis de restricción	55
3.2.2.2.3.1. Gel de agarosa	55
3.2.2.2.3.2. Análisis de restricción en <i>ABI Prism 3100</i>	56
3.2.2.2.4. dHPLC	59
3.2.2.2.5. Secuenciación automática	61
3.2.2.3. Análisis indirecto: estudio familiar	62
3.2.3. Herramientas bioinformáticas	64
3.2.3.1. Herramientas <i>online</i>	64
3.2.3.2. Diseño de la base de datos de distrofias de retina	65
3.2.3.2.1. Pantalla principal	65
3.2.3.2.2. Datos generales	66
3.2.3.2.3. Antecedentes geográficos	67
3.2.3.2.4. Datos oftalmológicos	68
3.2.3.2.5. Resultados	71
3.2.3.2.6. Pantalla de listados	72
4. Resultados	75
4.1. Esquema general de resultados	76
4.2. Estudio directo: microarray LCA en familias LCA y RP-IP	78

4.3. Estudio familiar	81
4.3.1. Familias consanguíneas y/o endogámicas	81
4.3.2. Mutaciones frecuentes	82
4.3.3. Cribado de genes	86
4.3.3.1. Estudio del gen <i>CRB1</i>	86
4.3.3.2. Estudio del gen <i>CEP290</i>	96
4.3.3.3. Estudio del gen <i>RDH12</i>	99
4.3.3.4. Estudio del gen <i>AIPL1</i>	101
4.3.3.5. Estudio del gen <i>CRX</i>	103
4.3.3.6. Estudio del gen <i>RPGRIP1</i>	105
4.3.3.7. Estudio del gen <i>GUCY2D</i>	108
4.4. Análisis de resultados	110
4.4.1. Familias caracterizadas en LCA y RP-IP	110
4.4.2. Familias caracterizadas según consanguinidad/endogamia	111
4.4.3. Espectro de genes responsables de LCA y RP-IP en España	112
4.4.4. Frecuencia de LCA en población española	113
4.4.5. Frecuencia de <i>CRB1</i> en población española	113
4.5. Distribución geográfica	114
4.5.1. Familias LCA	114
4.5.2. Familias RP-IP	115
4.5.3. Familias con mutaciones en <i>CRB1</i>	116
4.5.4. Cambio p.Asp1114Gly (<i>RPGRIP1</i>)	117
4.5.5. Mutación p.Cys948Tyr (<i>CRB1</i>)	120
4.5. Correlación genotipo-fenotipo	122
4.5.1. Gen <i>CRB1</i>	122
4.5.2. Gen <i>CEP290</i>	127
4.5.3. Gen <i>RDH12</i>	127
5. <u>Discusión</u>	129
5.1. Esquema general de la discusión	130
5.2. Cambios frecuentes: mutaciones patogénicos <i>versus</i> polimorfismos	131
5.2.1. Cambio p.Asp1114Gly en <i>RPGRIP1</i>	131
5.2.2. Cambio p.Pro701Ser en <i>GUCY2D</i>	132
5.2.3. Cambio p.Tyr134Phe en <i>AIPL1</i>	133

5.2.4. Mutación p.Cys948Tyr en <i>CRB1</i>	133
5.3. Cribado de genes candidatos	135
5.3.1. Estudio del gen <i>CRB1</i>	135
5.3.1.1. <i>CRB1</i> : Mutación p.Ile205Thr	135
5.3.1.2. <i>CRB1</i> : Nuevas mutaciones identificadas	137
5.3.1.3. <i>CRB1</i> : Familias con una sola mutación en heterocigosis	140
5.3.2. Estudio del gen <i>CEP290</i>	141
5.3.3. Estudio del gen <i>RDH12</i>	142
5.3.4. Estudio del gen <i>AIPL1</i>	143
5.3.5. Estudio del gen <i>CRX</i>	144
5.3.6. Estudio del gen <i>RPGRIP1</i>	145
5.3.7. Estudio del gen <i>GUCY2D</i>	146
5.4. Familias digénicas y/o trialélicas	147
5.4.1. <i>CRB1</i> y <i>RPGRIP1</i> : Familia LCA-0038	148
5.4.2. <i>CRB1</i> y <i>RPGRIP1</i> : Familia RP-0137	150
5.4.3. <i>CRB1</i> y <i>RPGRIP1</i> : Familia RP-0310	150
5.4.4. <i>CRB1</i> y <i>RPGRIP1</i> : Familia RP-1017	150
5.4.5. <i>CRB1</i> y <i>GUCY2D</i> : Familias LCA-0012 y LCA-0042	151
5.4.6. <i>CEP290</i> y <i>RPGRIP1</i> : Familias LCA-0037 y LCA-0039	151
5.4.7. <i>CRX</i> y <i>RPGRIP1</i> : Familia RP-0997	153
5.5. Familias caracterizadas en LCA y RP-IP	155
5.6. Espectro de genes responsables de LCA y RP-IP en población española	158
5.7. Distribución geográfica	164
5.7.1. Familias con mutaciones en <i>CRB1</i>	164
5.7.2. Cambio p.Asp1114Gly (<i>RPGRIP1</i>)	168
5.7.3. Mutación p.Cys948Tyr (<i>CRB1</i>)	168
5.8. Correlación genotipo-fenotipo	169
5.8.1. Gen <i>CRB1</i>	169
5.8.2. Gen <i>CEP290</i>	171
5.8.3. Gen <i>RDH12</i>	172
5.9. Diseño de un algoritmo diagnóstico	173
6. Conclusiones	176

7. <u>Bibliografía</u>	179
8. <u>Publicaciones derivadas de este trabajo</u>	198
9. <u>Anexos</u>	202
9.1. Anexo I: Consentimiento informado pacientes	203
9.2. Anexo II: Consentimiento informado donantes voluntarios	209



“Santa Lucía”

Federico Barocci, finales del siglo XVI

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

Quizá me extienda algunas líneas, pero este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda de muchas personas que han influido en toda mi vida, a ellas quiero dedicarles al menos unos folios, porque se lo merecen y este trabajo es mérito suyo.

En primer lugar quiero agradecer la oportunidad que me brindaron Carmen Ayuso y Carmen Ramos al aceptarme como asistente voluntario en el laboratorio. Aquel periodo fue para mí, no sólo un aprendizaje de genética, sino la oportunidad de trabajar con un grupo de personas que me fascinaron desde el primer momento, y lo mejor era que estaban dispuestas a transmitirme sus conocimientos.

Más tarde fue la Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz la que me concedió una beca para poder realizar mi tesis doctoral en el Servicio de Genética de la FJD, nunca les estaré lo suficientemente agradecida por esta oportunidad. En especial a Marta Jiménez.

En particular, tengo que agradecer a Carmen Ayuso que haya dirigido mi tesis doctoral, ya que ha sido un privilegio trabajar al lado de alguien tan brillante y luchadora. Gracias Carmen, eres la fuerza del laboratorio.

Carmen Ramos no ha dirigido la tesis directamente pero ha influido muy positivamente en ella con su apoyo constante. Gracias Carmen, eres el espíritu del laboratorio.

Todos mis compañeros tienen algo que les caracteriza y les hace especiales, por si alguien no se ha dado cuenta, aquí van unas líneas sobre lo mejor de cada uno de ellos y por qué les agradezco su contribución.

- § A Ana y Dan, porque habéis sido mis compañeros inseparables en estos años. Porque me habéis ayudado a pensar. Porque me habéis apoyado siempre y porque sólo vosotros sabéis lo que os quiero, gracias por estar ahí.
- § A M^a José, por la pasión que transmites a las cosas, porque me enseñaste mis primeros pasos en genética y otros que nada tenían que ver con el ADN.

- § A Jesús, porque con tu espíritu “desordenado” eres capaz de adaptarte a todos nosotros, porque sabes cuando echar una mano y porque eres un amigo.
- § A Rosa, porque eres mi ángel de la guarda, porque me aconsejas cuando debes y me apoyas cuando me equivoco.
- § A Almu, porque el día que te des cuenta de lo inteligente que eres, verás que me has superado hace ya mucho tiempo. Gracias por ser mi amiga y compartir conmigo todo este tiempo.
- § A Chony, porque sabes escuchar y eres una buena amiga. Gracias por ser el “cerebro” de la RP.
- § A Diego, al que considero “nuestro genio particular” y que llegará tan lejos como él quiera, pero si quiere, claro. Porque siempre has estado ahí ayudándome a pensar un poco más de lo establecido.
- § A Nuria, porque te empeñas en no dejar ver al mundo lo valiosa que eres y eso nos permite tenerte como un tesoro.
- § A Carolina Arroyo, por enseñarme lo que era un laboratorio y cómo funcionaba, por ayudarme a integrarme en este mundo.
- § A María García-Hoyos, porque de ti he aprendido mucho de lo que sé y sobre todo a terminar lo que uno empieza.
- § A Amelia, porque te echo mucho de menos y dejaste una huella importante en el laboratorio.
- § A Miguel Ángel, gracias por ser sincero, gracias por ser una buena persona y sobre todo gracias por ayudarme todas las veces que lo necesito.
- § A Cristina, porque haces que todo nuestro trabajo funcione y siempre sirves de apoyo. Gracias por interesarte siempre por mi trabajo.
- § A Susana Maia, nuestro “cachito” de Portugal. Gracias por alegrarnos la vida.
- § A Cécile, nuestro “cachito” de Francia. Gracias por todo lo que me ayudaste.
- § A Robert Wilke, nuestro “cachito” de Alemania. Gracias por compartir seis divertidos meses con nosotros y haberme ayudado tanto con mi trabajo.
- § A Jana, porque eres honesta y sabes cuando alguien necesita una mano.
- § A Rocío, porque eres una persona discreta pero siempre estás ahí. Gracias por tu constante apoyo.
- § A Aurora, por tu ayuda alegre y muchas veces poco reconocida.

- § A Isa, por transmitir tranquilidad y ofrecer siempre una palabra de ánimo. Gracias por estar ahí siempre que uno te necesita.
- § A Toñi, porque siempre me tratas con cariño.
- § A Tere, por tu capacidad de acoger a la gente cuando llega y hacer que nos sintamos como en casa.
- § A Marta, porque eres entusiasta y mi profesora de citogenética.
- § A Carmen Gaci, porque me enseñaste los cultivos y porque siempre sonríes.
- § A Fernando, porque siempre tienes un gesto amable y sirves de apoyo.
- § A María Fenollar, por tu optimismo e inteligencia, gracias por traer aire fresco cada vez que entras en el laboratorio.
- § A las nuevas adquisiciones: Belén, Mónica, Carmen Laura, Eva, Fernando y Víctor, por echarnos una mano con nuestro trabajo y traer nuevas fuerzas al laboratorio. No sería justo no agradecer especialmente a Belén, Cécile y Mónica las energías que le dedicaron a esta tesis, confirmando algunos de los resultados obtenidos.

Fuera de las puertas de laboratorio hay mucha gente que hace posible nuestro trabajo y han contribuido a esta tesis, ahí van:

A José Fernández Piqueras, mi tutor durante mis estudios de postgrado. Gracias por ser siempre tan atento y tan amable. Es un honor para mí que firme este trabajo.

A todos los investigadores y becarios de la red EsRetNet, con los que he compartido muy buenos momentos, que es lo que hace que de verdad una red funcione. Gracias por todo lo que investigáis que nos vale de apoyo a los demás, gracias por vuestro esfuerzo y por vuestro compañerismo.

Al Departamento de Oftalmología de la FJD, especialmente a Blanca García Sandoval y Nacho Tapias, por su esfuerzo tanto profesional como personal. Gracias por ser nuestros ojos.

A Nacho Tapias, porque has pasado de ser el oftalmólogo de apoyo a ser un amigo con quien compartir buenos momentos, gracias por echarme una mano pero sobre todo por ser la persona que eres.

A otros investigadores que colaboran estrechamente con nosotros y hacen nuestro camino más fácil e interesante: Eduardo D. Silva, Miguel Carballo, Montserrat Baiget, Diana Valverde, José M^a Millán, Guillermo Antiñolo, Pedro de la Villa, Enrique de la Rosa, Juan José Tellería, Yolanda Diebold, Ángel Carracedo, Markus Preising, Paola Bovolenta y Santiago Rodríguez de Córdoba, entre otros. Me dejo a muchos en el tintero, lo siento.

De forma especial quiero agradecer su participación a los pacientes, sin los cuales este trabajo no sería posible. Nuestro deseo no es sólo el de diagnosticar, nuestro deseo es poder curaros.

A toda la gente que ha participado en este trabajo sin saberlo, porque lo han hecho siempre sin esperar nada a cambio: Valentín Calvo, Álvaro Úbeda, Nieves Martínez, Juan Moreno, Luis Arnés, Pilar Tornero, Juan Antonio Ardura, Verónica Alonso, Raúl Berruguete, Miriam Bellido (gracias por saludar siempre por los pasillos como si fuera lo mejor que te ha pasado en el día) y M^a del Mar González (Curra). A todos vosotros gracias.

A Manolo, Susana e Irene, por ser una segunda familia con la que compartir buenos y malos momentos, y sobre todo, una vida juntos. Gracias por haber estado siempre ahí.

A mis amigos del alma, Patricia, Ángel, Giusy, Massimo y Emanuele, gracias.

Ad Assunta e Luigi, grazie dell'accoglienza che mi avete sempre dato, grazie di farmi sentire come se fossi della famiglia. Anche grazie a voi questo lavoro è stato possibile.

A mi padre, porque me has enseñado a pensar y a razonar basándome en la observación paciente de las cosas. Porque todo lo que me has transmitido me ha hecho llegar donde estoy, sin tu empeño y tu constancia, nunca hubiera llegado hasta aquí.

A mi madre, porque si algún día llego a ser la mitad de inteligente que tú ya será mucho. Porque me has enseñado a ser honesta y coherente en la vida. Porque algunos genes heredados de ti se expresan más de lo normal.

A mi hermana, porque has sido mi apoyo constante y los pies sobre la tierra. Porque eres más inteligente que yo y te empeñas en no demostrarlo. Gracias *maita*.

A mis abuelos, por haber establecido las bases de lo que tengo, por haber confiado siempre en mí y por darme vuestro apoyo constante.

A Kinzica: “*Fuera del perro, un libro es el mejor amigo del hombre, y dentro del perro está demasiado oscuro para leer*” (Groucho Marx). Gracias por ayudarme a escribir la tesis hecha “un roscó” bajo mis pies.

A Simona, scusami, ma no ho parole per ringraziarti di tutto quello che hai fatto per me, non esistono. Sei eccezionale Simona, sei unica.

A todos vosotros, por el apoyo que me habéis prestado tanto a nivel profesional como personal en todo momento. Gracias por traerme hasta aquí. Sin vosotros no hubiera sido posible.

Elena Vallespín García
Madrid, 3 de enero de 2008

PRÓLOGO

Prólogo

Cuando D. Carlos Jiménez Díaz comenzaba la investigación de alguna patología, esta búsqueda estaba siempre ligada al paciente, y así comenzó en la Fundación Jiménez Díaz lo que más adelante se conocería como investigación clínica aplicada, a la que ahora conocemos como “Medicina Traslacional”.

En los años 80, de una forma poco natural, se empezó a distinguir entre investigación clínica y básica, en esta última había una amplia distancia entre el experimento y su aplicación práctica. Sin embargo, la investigación básica fue ganando terreno como investigación buena, mientras que la clínica era considerada la hermana pobre.

Fue otro de nuestros maestros, el profesor Mariano Jiménez Casado, el que vino a poner las cosas en su sitio diciendo que no se podía distinguir entre investigación clínica o básica, sino sencillamente entre investigación buena o mala, y que la investigación sobre pacientes o patologías podría ser tan buena o tan mala como se quisiera dependiendo de la originalidad y del proyecto que seguir.

Pues bien, en este caso, nos hallamos frente a un trabajo de experimentación básico, realizado para su aplicabilidad en pacientes y con el enfoque multidisciplinar que requiere todo proyecto de investigación que quiera llegar a buen fin. De hecho, la autora, en un párrafo de la discusión ya señala que *“el trabajo combinado entre los oftalmólogos, los clínicos y el laboratorio lleva a aumentar la eficiencia del estudio”*.

Las patologías que se estudian en la presente Tesis son las distrofias hereditarias de la retina, que son un conjunto de enfermedades degenerativas y generalmente progresivas, causadas por la afectación primaria de los fotorreceptores y que afectan a una de cada tres mil personas. Sus tres características más sobresalientes son su carácter hereditario, la evolución progresiva y no tener, en el momento actual, un tratamiento ni paliativo ni curativo, con lo que conducen a la pérdida total o parcial de la visión.

Así uno de los objetivos de este estudio ha sido identificar las mutaciones en el genoma humano, las cuales pueden ser la causa de los cambios metabólicos que conducen a estas enfermedades hereditarias. Para ello se han aplicado nuevas herramientas (microarrays) que están surgiendo actualmente para el diagnóstico clínico y que superan las que existían hace tan solo unos pocos años. Además, la identificación de las mutaciones dentro de las familias permite llegar a otro de los avances en este tipo de investigación, el llamado asesoramiento genético, que en estas familias es muy importante.

Otro de los hechos que ponen de manifiesto que las investigaciones de laboratorio no son hechos aislados, es el estudio a nivel mundial del espectro mutacional del gen CRB1, donde se observa una gran diferencia con los países colindantes con España, y por el contrario, una similitud entre España, Bélgica y Holanda.

Con todos estos hechos, podemos decir que estamos en un paso importante dirigido al diagnóstico, prevención y posterior tratamiento de enfermedades que causan ceguera desde los primeros meses de vida.

Un padre dominico de la basílica de Nuestra Señora de Atocha en Madrid dijo en una ocasión que, cuando se produce un avance científico que descubre la causa de una enfermedad, entonces es cuando se cumple una de las peticiones del Padre Nuestro que dice “*Venga a Nosotros Tu Reino*”.

Dra. Rosa García Delgado

CLAVE DE ABREVIATURAS

Clave de abreviaturas

A

ADRP	Retinosis Pigmentaria autosómica dominante (del inglés, <i>Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa</i>)
AAV	Virus asociado a adenovirus
<i>AIPL1</i> [604392]	<i>Arylhydrocarbon-interacting receptor protein-like 1</i>
APEX	<i>Arrayed Primer Extension</i>
ARRP	Retinosis Pigmentaria autosómica recesiva (del inglés, <i>Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa</i>)
<i>ATF4</i> [604064]	<i>Activating transcription factor 4</i>
<i>ATXN7</i> [607640]	<i>Ataxin 7</i>
AV	Agudeza Visual

C

<i>CEP290</i> [610142]	<i>Centrosomal protein 290 kDa</i>
CN	Ceguera Nocturna
<i>CRALBP</i> [18009]	<i>Cellular Retinaldehyde-binding protein</i>
<i>CRB1</i> [600105]	<i>Crumbs homolog 1</i>
<i>CRBP1</i> [180260]	<i>Cellular Retinol-binding protein 1</i>
<i>CRX</i> [120970]	<i>Cone-rod otx-like photoreceptor homeobox transcription factor</i>
CV	Campo Visual
<i>DCB2</i>	Distrofia de conos bastones tipo 2

D

dHPLC	<i>denaturing High-Performance Liquid Chromatography</i>
-------	--

E

EGFCA	Dominio <i>Calcium-binding EGF-like</i>
EGFL	Dominio <i>Epidermal growth-factor-like</i>
EPR	Epitelio pigmentario de la retina
ERG	Electrorretinograma

F

FO	Fondo de ojo (funduscopia)
----	----------------------------

G

<i>GUCY2D</i> [600179]	<i>Retinal-specific guanylate cyclase</i>
------------------------	---

I

<i>IMPDH1</i> [146690]	<i>Inosine monophosphate dehydrogenase 1</i>
------------------------	--

L

LamG	Dominio <i>Laminin A G-like</i>
LCA	Amaurosis congénita de Leber (del inglés, <i>Leber Congenital Amaurosis</i>)
<i>LCA5</i> [604537]	<i>Lebercilin</i>
<i>LRAT</i> [604863]	<i>Lecithin retinol acyltransferase</i>

M

<i>MERKT</i> [604705]	<i>Mer Tyrosine Kinase Protooncogene</i>
<i>MPP5</i> [606958]	<i>Membrane Protein, Palmitoylated 5</i>

N

<i>NPHP4</i> [607215]	<i>Nephrocystin 4</i>
<i>NR2E3</i> [604485]	<i>Nuclear Receptor Subfamily, Group , Member 3</i>

NRL [162080]	<i>Neural Retina Leucine Zipper</i>
NUB1 [607981]	<i>Nedd8 ultimate buster 1</i>
NJ	<i>Neighbor-join</i> “Unión de Vecinos”

O

OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
------	--

P

PATJ [603199]	<i>Inad, Drosophila, Homolog of</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDE6B [180072]	<i>Phosphodiesterase 6B, cGMP-specific, Rod, Beta</i>
PEV	Potenciales evocados
PPRPE	Epitelio paraarteriolar preservado

Q

QRX [610362]	<i>Q50-Type Retinal Homeobox</i>
--------------	----------------------------------

R

RD3 [180040]	<i>Retinal Degeneration 3, Mouse, Homolog of</i>
RDH12 [608830]	<i>Retinol dehydrogenase 12</i>
RPE65 [180069]	<i>Retinal pigment epithelium-specific 65kD protein</i>
RPGR [312610]	<i>Retinitis Pigmentosa GTPase Regualtor</i>
RPGRIP1 [605446]	<i>Retinitis Pigmentosa GTPase regulator-interacting protein 1</i>
RP-IP	Retinosis Pigmentaria de inicio precoz

S

SSCP	<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>
------	--

SRP	Retinosis Pigmentaria esporádica (del inglés, <i>Sporadic Retinitis Pigmentosa</i>)
STR	<i>Short Tandem Repeat</i>
T	
TM	Transmembrana
T _m	Temperatura de fusión
<i>TULP1</i> [602280]	<i>Tubby-like protein 1</i>
X	
XLRP	Retinosis Pigmentaria ligada al cromosoma X (del inglés, <i>X-linked Retinitis Pigmentosa</i>)



Detalle de “La creación de Adán”

Michelangelo Buonarroti, 1510

Copia S. Cheli

INTRODUCCIÓN

1.1. Breve descripción de la anatomía y fisiología de la retina

En 1583 Félix Platter (1536-1614) demostró por primera vez que la retina era el lugar donde se producía la fotorrecepción. Para ello cortó los ligamentos del cristalino y observó que la visión no desaparecía. Ya en el siglo XVI Leonardo da Vinci (1452-1519), postuló que la formación de la imagen visual debía formarse en la retina. La prueba matemática y óptica la ofreció el matemático Johannes Kepler (1571-1630) en 1604 quien demostró que la luz se refractaba en la córnea y el cristalino para formar una imagen invertida sobre la retina. En 1684 Antony Van Leeuwenhoek (1632-1723), que estudió todo tipo de muestras, usando para sus observaciones lentes simples, pulidas y montadas con engarces de oro y plata, describió las estructuras que más tarde serían conocidas como los conos y los bastones. Dos siglos más tarde, en 1893, Ramón y Cajal (1852-1934) completa la anatomía de la retina.

La retina es esencialmente una porción del cerebro que se proyecta hacia las estructuras superficiales del organismo con el fin de recibir los rayos luminosos que provienen del mundo exterior. Aunque todas las partes del ojo son importantes para percibir la información visual, la retina es quizás la parte vital del sistema.

La luz entra al ojo a través de la córnea. Atraviesa la cámara anterior, el cristalino y el humor vítreo y llega a la retina. Una vez aquí debe atravesar todas las capas de la retina antes de interactuar con la porción donde se encuentra los elementos fotosensibles: conos y bastones (Fig. 1.1).

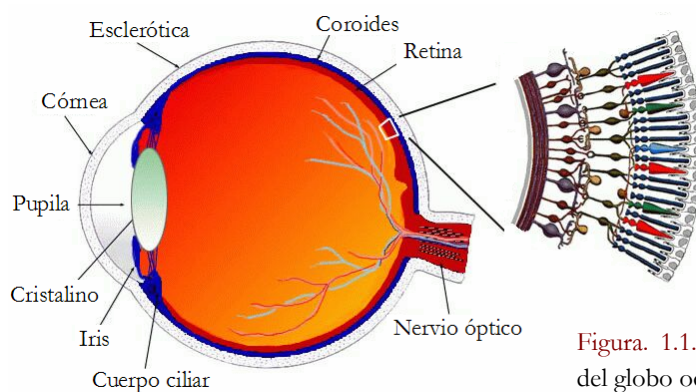


Figura. 1.1. Representación esquemática del globo ocular y de la retina humana.

En vertebrados la retina está compuesta por tres capas que contienen cuerpos celulares y dos capas de interacciones sinápticas, denominadas plexiformes (Fig. 1.2).

En la capa nuclear externa es donde se encuentran los fotorreceptores. La capa nuclear interna contiene los cuerpos celulares de las células horizontales, bipolares y amacrinas y la capa de células ganglionares contiene los cuerpos celulares de éstas células además de algunas amacrinas desplazadas. Entre estas tres capas se localizan las capas plexiformes donde se realizan la mayor parte de contactos sinápticos de la retina.

La capa plexiforme externa es donde contactan los conos y bastones con las dendritas de las células bipolares y con las células horizontales. En la plexiforme interna se produce la segunda sinapsis de la vía vertical de la retina. Aquí contactan los axones de las células bipolares con las dendritas de las células ganglionares. Además a este nivel terminan gran cantidad de prolongaciones de las células amacrinas, que modulan la información que es pasada a las células ganglionares. Estas células ganglionares son en última instancia las que mandan la información ya codificada hacia el sistema nervioso central a través del nervio óptico.

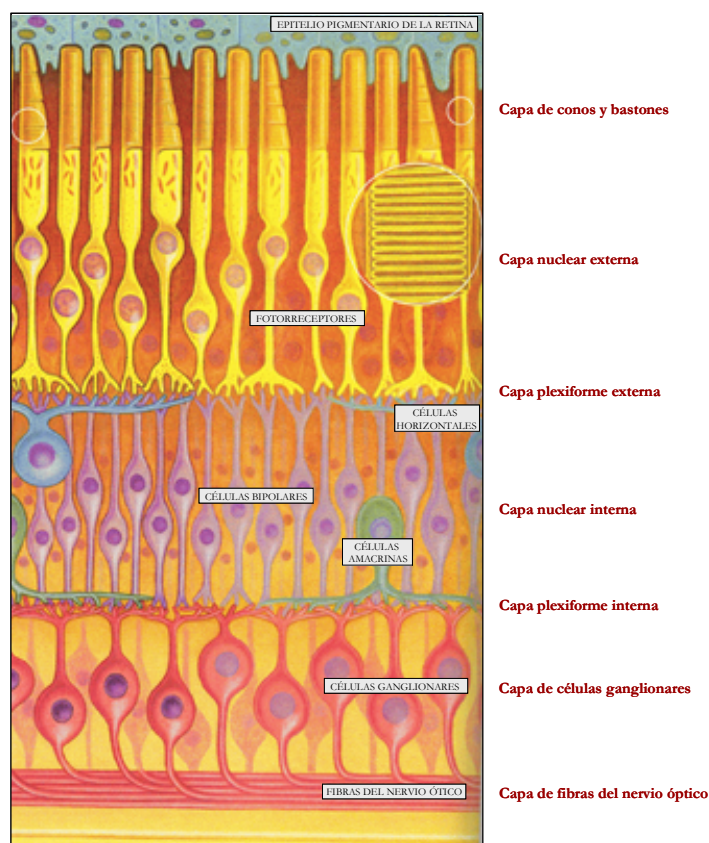


Figura 1.2. Representación esquemática de las capas de la retina.

La estructura de los conos y bastones es bastante uniforme tanto estructural como funcionalmente (Fig. 1.3). Cada célula receptora contiene un cilio rudimentario que conecta con el segmento externo, el cual contiene las membranas receptoras, el segmento interno, que contiene el núcleo, mitocondrias y contactos sinápticos.

Las membranas receptoras de las células visuales de los vertebrados consisten en lamelas aplanadas derivadas de la membrana superficial cerca del origen del segmento externo.

En los conos, el lumen de cada lamela está abierto al exterior de la célula. En los bastones, las lamelas están separadas completamente de la membrana superficial del segmento externo, formando sacos aplanados o discos. La pila de discos está completamente confinada dentro de la membrana superficial de la célula visual y las moléculas de fotorpigmento están incrustadas a las membranas de los discos y se denominan opsinas. Las opsinas son proteínas que participan en la fototransducción: absorben luz a distintas longitudes de onda, transformándola en impulsos nerviosos.

En el caso de los bastones, cuya función principal es la visión nocturna, su fotorpigmento es la Rodopsina. En el caso de los conos, células responsables de la visión diurna y el color, su fotorpigmento se puede dividir en tres tipos: azules, rojos y verde, según la longitud de onda a la que son capaces de captar la energía procedente de la luz.

En los bastones y conos, la luz produce un potencial receptor hiperpolarizante. En la oscuridad la membrana superficial del segmento externo del bastón es igualmente permeable al Na^{2+} y K^{+} . Los iones de sodio entran al interior del segmento externo a través de canales que están permanentemente abiertos en condiciones de oscuridad. Los iones sodio que transportan la corriente sensible a la luz hacia el interior o corriente oscura, eluden su acumulación en la célula por la acción ininterrumpida de la bomba $\text{Na}^{2+}/\text{K}^{+}$ alimentada metabólicamente.

Tras la absorción de luz por el fotorreceptor, la permeabilidad al sodio del segmento externo disminuye, causando una reducción en la corriente oscura y una hiperpolarización del potencial de membrana. Cuando el estímulo luminoso cesa, la permeabilidad al sodio de la membrana vuelve a su elevado nivel de reposo.

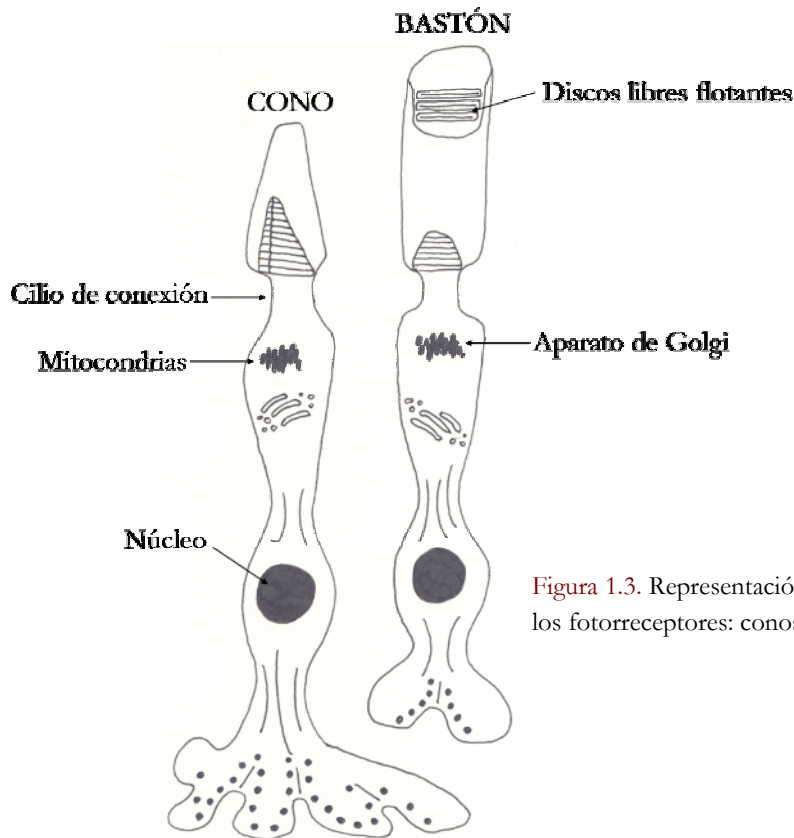


Figura 1.3. Representación esquemática de los fotorreceptores: conos y bastones.

Los cambios en el potencial de membrana producidos de esta manera son transmitidos al segmento interno de la célula visual por la simple propagación de cable, y allí los cambios en el potencial de membrana modulan la continua liberación de neurotransmisor de los lugares presinápticos localizados en las porciones basales del segmento interno. De este modo, la actividad eléctrica de la célula receptora visual influye sobre la actividad eléctrica de las células retinianas y las fibras del nervio óptico.

Cada molécula de rodopsina consiste en siete porciones transmembranas que rodean al 11-*cis* retinal. Cuando un fotón de luz llega a esta nivel el cromóforo se isomeriza y pasa de la forma 11-*cis* a la forma *trans*, lo cual da lugar a cambios conformacionales de la proteína, que producen lo que se denomina como

blanqueamiento de la rodopsina. Durante este proceso se forman varios metabolitos intermediarios como la Metarodopsina II que activa a una proteína G especial, conocida como Transducina que al final va a desencadenar la cascada de la fototransducción.

Cuando la retina esta en condiciones de oscuridad, se encuentran abiertos una serie de canales iónicos a nivel de los segmentos externos de los fotorreceptores que permiten principalmente la entrada de iones sodio. Esta entrada de sodio, despolariza parcialmente a los fotorreceptores, permitiendo la liberación de neurotransmisor a nivel de sus terminales sinápticos.

Cuando la luz estimula a la molécula de rodopsina, se producen una serie de señales que van a producir el cierre de los canales iónicos permeables al sodio. Por tanto cesa la entrada de sodio y el fotorreceptor se hiperpolariza, con lo que deja de liberar neurotransmisor [Stryer, 1991; Yau, 1994 y Kawamura, 1995].

Las células bipolares son las primeras células que establecen sinapsis con los fotorreceptores tras ser estimulados por la luz y que a su vez establecen sinapsis con las células horizontales. Existen dos tipos, las que se hiperpolarizan y las que se despolarizan.

Las células horizontales presentan terminales postsinápticos con las células receptoras y presinápticos con las células bipolares y los conos. Estas células responden a la luz con una hiperpolarización, pero a la vez existen sinápsis recíprocas desde las células horizontales hacia los fotorreceptores. Estas sinápsis hacen que la información de las redes de células horizontales, que se encuentran extensamente acopladas a través de contactos eléctricos realicen una suma espacial de los estímulos colaborando en la organización centro/periférica de los campos receptores de las células ganglionares.

Las células amacrinas, son muy variadas morfológica y funcionalmente, en ellas se generan sinapsis eléctricas y químicas. No reciben conexiones directas de los fotorreceptores, sino sólo de células bipolares y de otras células amacrinas, estableciendo a su vez conexiones con células ganglionares y retroalimentando

también a las células bipolares. Por tanto forman la vía de asociación lateral a nivel de la plexiforme interna.

Las células ganglionares, son las únicas de la retina capaces de generar potenciales de acción. Existen aproximadamente un millón de este tipo de células. Los axones de las células ganglionares constituyen el nervio óptico cuya entrada, junto con la de los vasos retinianos forma el punto ciego de la retina. Su axón se sitúa a nivel de la capa de las fibras del nervio óptico y sólo se mieliniza a nivel del nervio óptico, por fuera ya del globo ocular.

Las células gliales de Müller son células gliales especiales, cuyos núcleos se sitúan en la capa nuclear externa y cuyas prolongaciones se extienden a través de todas las capas, desde la limitante externa a la limitante interna. Constituyen un tejido de sostén para los diversos tipos celulares, intervienen en la nutrición retiniana mediante el acúmulo de glucógeno y ejercen una función defensiva mediante la fagocitosis.

1.2. Aspectos clínicos y genéticos de las distrofias hereditarias de retina

Las distrofias hereditarias de la retina son un conjunto de enfermedades degenerativas y generalmente progresivas, causadas por la afectación primaria de los fotorreceptores, que ocurren en 1 de cada 3000 personas. Sus tres características más sobresalientes son su carácter hereditario, la evolución progresiva y no tener, en el momento actual, un tratamiento ni paliativo ni curativo, con lo que conducen a la pérdida total o parcial de la visión [Rivolta *et al.*, 2002].

Las causas genéticas de las distrofias de retina son conocidas parcialmente, así como los problemas que ocasionan, esta tesis doctoral pretende contribuir en la medida de lo posible a desentrañar la base molecular de este grupo de patologías.

De un modo general se pueden dividir en:

1) **Formas centrales**, con degeneración de los conos en su inicio, pudiendo afectarse secundariamente o no los bastones (distrofias de conos → bastones). Entre las distrofias de retina centrales se encuentran la enfermedad de Stargardt, las distrofias maculares, las distrofias de conos, entre otras.

2) **Formas periféricas**, en las que se afectan inicial y predominantemente los bastones de la retina y cuyo paradigma es la Retinosis Pigmentaria (RP), sobre las cuáles trata este manuscrito.

1.2.1. Aspectos oftalmológicos de la RP

A continuación se hace un repaso de los aspectos oftalmológicos más característicos de la RP [García Sandoval, 2001].

1.2.1.1. Síntomas

Ceguera nocturna (CN): Es el síntoma más prevalente y precoz. La ceguera nocturna hace alusión a dos hechos diferentes, por un lado, a la imposibilidad de ver en ambientes de baja iluminación a pesar de haber permanecido el tiempo suficiente para estar adaptado a esta situación. Por otra

parte, a la dificultad de adaptación que pueda presentarse al pasar de un ambiente bien iluminado a otro de baja iluminación.

En el primer caso, si a pesar del tiempo de adaptación transcurrida en la oscuridad, el paciente no consigue ver objetos, se trata de una disfunción de los bastones y es el segmento correspondiente a ellos en la curva de adaptometría, el que muestra un umbral elevado.

En el segundo caso, cuando el paciente refiere tardar más en poder distinguir objetos que otros serían capaces de reconocer en menos tiempo pero al final lo consigue, la alteración corresponde a una disfunción de conos, puesta de relieve en el segmento de conos de la adaptometría. Los pacientes de RP tienen alteraciones de uno o ambos segmentos.

Disminución del campo visual (CV): Es otro síntoma característico de la RP, el paciente refiere tropezarse frecuentemente con los objetos a su alrededor. En el niño, es la madre la que cuenta que no es capaz de encontrar los juguetes. Cronológicamente este síntoma se presenta después de la CN.

Disminución de la visión: Normalmente es referida por los pacientes después de la CN y de la disminución de CV.

Alteración en la percepción de los colores: La percepción de los colores generalmente se mantiene normal hasta alcanzar agudezas visuales de 0.5 o menos. Cuando la enfermedad está muy avanzada se produce una alteración inespecífica de la visión de colores y con mucha frecuencia en el eje azul-amarillo.

Fotopsias: Muchos pacientes de RP refieren ver luces pequeñas o flashes en la periferia media de su CV cerca de zonas de escotoma absoluto.

Fotofobia: No es un síntoma constante pero sí frecuente.

1.2.1.2. Pruebas clínicas más relevantes

Campimetría: La alteración campimétrica de los pacientes afectados de RP comienza por una disminución generalizada, difusa, de sensibilidad. Posteriormente aparecen escotomas absolutos formando un anillo alrededor del campo central. Este defecto anular traduce la alteración de los bastones cuya mayor densidad se encuentra en la periferia media de la retina. El defecto anular se va extendiendo de forma centrífuga dando el aspecto de una constricción periférica del campo, pero lo hace también centrípetamente de manera que queda respetada el área central exclusivamente. Es lo que se denomina un campo central tubular, en cañón de escopeta o en túnel. Pueden quedar algunos islotes periféricos que luego desaparecerán. El limitado campo central en un principio presenta un umbral normal pero a medida que avanza la enfermedad, la densidad del escotoma aumenta. Otras veces desaparece el campo central quedando sólo algún islote, generalmente temporal, que será el último en desaparecer.

Funduscopia: Los hallazgos funduscópicos de los casos avanzados de RP, suelen ser bastante típicos, sin embargo, estos cambios reflejan una degeneración de larga evolución y muchos hallazgos pueden no observarse en estadios precoces. Por este motivo cuando se establecieron los criterios diagnósticos de esta enfermedad, el aspecto del fondo de ojo (FO) no se consideró necesario para realizar el mismo.

La falta de uniformidad en lo que antes constituía una sola enfermedad también tiene su expresión en la variabilidad de los hallazgos funduscópicos. La misma mutación puede tener varias expresiones fenotípicas, por ejemplo distintas lesiones en el FO. Por otra parte el mismo fenotipo puede corresponder a distintas mutaciones. Según qué células y capas retinianas estén afectadas y en según qué grado, así será la imagen oftalmoscópica.

Agudeza visual (AV) y estado refractivo: La disfunción visual en la RP puede ser de muy diverso grado, desde la ausencia de síntomas y visión de la unidad en las formas sectoriales, hasta visión de sólo percepción de luz. En la RP típica, la visión

central mantiene buenos niveles más tiempo. Al igual que la edad de comienzo de la enfermedad varía según el patrón hereditario, la edad en la que se produce el deterioro de la AV también es diferente según el tipo de herencia. Es precoz en las formas ligadas al sexo, incluso apreciable desde los 4-6 años y suelen ser ciegos legales (agudeza visual ≥ 0.1 en el mejor ojo) a la edad de 30-40 años [Berson *et al.*, 1985]. En las formas autosómicas recesivas se produce algo más tarde, en las formas dominantes se deteriora en la edad adulta y puede conservarse una buena agudeza visual a edades avanzadas, incluso por encima de los 60 años.

La electrofisiología: Las pruebas de electrofisiología ocular disponibles son variadas, pero la prueba por excelencia en el diagnóstico de la RP es el electrorretinograma (ERG) de campo completo (estímulo difuso en cúpula de *Ganzfeld*). Debe ser realizado siguiendo las normas internacionales de estandarización publicadas en 1989 por ISZEV (*International Standardization committee for Electrophysiology of the Vision*) [Marmor, 1989], y revisadas periódicamente por este organismo. Estas pruebas proporcionan información sobre el estado de los dos sistemas de fotorreceptores, bastones y conos, por separado y también información de ambos en conjunto, así mismo se puede valorar otras capas de la retina.

En la RP los cambios en el ERG pueden preceder a los hallazgos oftalmoscópicos, en los subtipos ligados al cromosoma X (XLRP) y autosómicos recesivos (ARRP) el ERG está abolido o se registran respuestas muy reducidas en edades precoces. El ERG en la RP además del valor diagnóstico, proporciona un método de monitorización de la progresión de la enfermedad y de la eficacia de medidas terapéuticas.

Adaptometría: La curva de adaptometría puede mostrar una elevación del segmento de conos, del de bastones o de ambos en grado variable. En algunos pacientes puede observarse un retraso en alcanzar lo que finalmente es un buen umbral de adaptación a la oscuridad de bastones.

1.2.2. Aspectos genéticos de la Retinosis Pigmentaria

La Retinosis Pigmentaria (RP) es una enfermedad hereditaria degenerativa extremadamente heterogénea. Se han descrito tipos de herencia autosómica dominante, autosómica recesiva, ligada al cromosoma X, herencia mitocondrial, trialelismo, digenismo, así como formas esporádicas.

Este trabajo se va a referir exclusivamente a las formas autosómicas recesivas y esporádicas de inicio precoz (RP-IP) y de tipo congénito (Amaurosis congénita de Leber, LCA).

1.2.2.1. La LCA y la RP-IP

La Amaurosis Congénita de Leber (LCA) es una alteración primaria de los fotorreceptores que se presenta de forma congénita o antes del primer año de vida. Fue descrita en 1869 por el oftalmólogo alemán Theodor Karl Gustav von Leber (1840-1917, Fig. 1.4), quién describió esta patología cuando observó en una escuela de niños invidentes que el 25% de ellos eran hijos de padres consanguíneos [Leber, 1869].

La LCA es una enfermedad extraordinariamente heterogénea, tanto clínica como genéticamente. Esta característica fue observada por Waardenburg [1963] cuando describió el caso de hijos sanos nacidos de parejas donde ambos padecían la enfermedad.

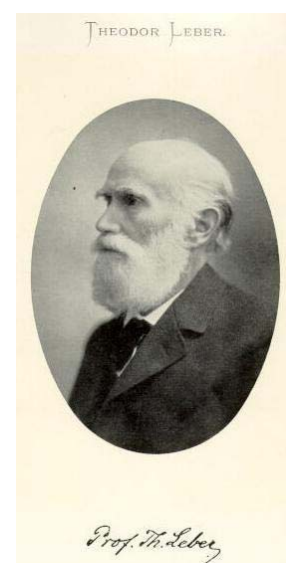


Figura 1.4. Theodor Karl Gustav von Leber (1840-1917)

Leber describió la LCA como una patología caracterizada por una pérdida grave de la visión que se presenta de forma congénita o a los pocos meses de vida, nistagmo, reacción pupilar lenta y retinopatía pigmentaria, así como un fondo de ojo normal en la infancia con afectación progresiva a lo largo de la vida del paciente. No fue hasta casi un siglo más tarde cuando Franceschetti y Dieterle [1954] añadieron a

estos síntomas el resultado del análisis electrofisiológico, el cual en el caso del eletrorretinograma (ERG) estaría abolido y los potenciales provocados (PEV) pueden estar extinguidos o alterados. Actualmente este diagnóstico es esencial para la LCA. Los criterios clínicos para el diagnóstico de la LCA han sido finalmente establecidos por De Laey [1991].

En la LCA existe una pérdida grave tanto de bastones como de conos en toda la retina desde el nacimiento. Supone cerca del 5% de los casos de distrofia retiniana y entre el 10-18% de los casos de ceguera congénita [Kaplan *et al.*, 1990]. Su incidencia es de 2-3 por cada 100.000 nacidos vivos.

La LCA se presenta en algunos pacientes asociada a rasgos sistémicos, donde puede estar involucrado el aparato renal, el cardíaco o el sistema nervioso central.

En la mayor parte de los casos, la herencia es autosómica recesiva, pero se han descrito algunos pacientes con un patrón autosómico dominante [Heckenlively, 1988; Sohocki *et al.*, 1998; Tzekov *et al.*, 2001]. A su vez, se han descrito casos de trialelismo (tres alelos causan la enfermedad) y digenismo (mutaciones en dos genes diferentes son las responsables de la patología).

Hasta el momento se han descrito 13 genes y 2 loci responsables de LCA (Tabla 1.1). Todos estos genes se expresan preferentemente en la retina o el epitelio pigmentario de la retina.

Algunos autores afirman que estos 13 genes justifican del 60-75% de los casos de LCA [Koenekoop *et al.*, 2007 y Sweeney *et al.*, 2007], pero en cambio otros estudios [Simonelli *et al.*, 2007 y el presente trabajo] detectan del 28 al 34,7% de los casos LCA, lo que indica la importancia de la población en la que se haga el estudio.

Las mutaciones en la mayoría de estos genes producen un fenotipo de LCA así como fenotipo de RP-IP, donde la enfermedad se diagnostica antes de los 10 años de vida pero no de forma congénita. Por este motivo para este trabajo se han seleccionado familias con ambos fenotipos.

Gen	OMIM	Localización	Proteína	Fenotipo asociado	Bibliografía
<i>AIPL1</i>	604392	17p13.1	<i>Arylhydrocarbon-interacting receptor protein-like 1</i>	LCA recesiva DCB dominante	[Sohocki <i>et al.</i> , 2000; Hameed <i>et al.</i> , 2000]
<i>CEP290</i>	610142	12q21.32	<i>Centrosomal protein 290 kDa</i>	LCA recesiva Síndrome de Senior-Locken Síndrome de Joubert	[den Hollander <i>et al.</i> , 2006]
<i>CRB1</i>	600105	1q31.3	<i>Crumbs homolog 1</i>	LCA recesiva ARRP Atrofia coriorretinal dominante	[Lotery <i>et al.</i> , 2001; den Hollander <i>et al.</i> , 2001]
<i>CRX</i>	120970	19q13.32	<i>Cone-rod otx-like photoreceptor homeobox transcription factor</i>	LCA dominante y recesiva DCB dominante ADRP	[Freund <i>et al.</i> , 1998]
<i>GUCY2D</i>	600179	17p13.1	<i>Retinal-specific guanylate cyclase</i>	LCA recesiva DCB dominante	[Camuzat <i>et al.</i> , 1995; Camuzat <i>et al.</i> , 1996]
<i>IMPDH1</i>	146690	7q32.1	<i>Inosine monophosphate dehydrogenase 1</i>	LCA dominante ADRP	[Bowne <i>et al.</i> , 2006]
<i>LCA5</i>	604537	6q14.1	<i>Lebercilin</i>	LCA recesiva	[Dharmaraj <i>et al.</i> , 2000; den Hollander <i>et al.</i> , 2007]
<i>LRAT</i>	604863	4q32.1	<i>Lecithin retinol acyltransferase</i>	LCA recesiva	[Ruiz <i>et al.</i> , 1999]
<i>RD3</i>	180040	1q32.3	<i>RD3 protein</i>	LCA recesiva	[Friedman <i>et al.</i> , 2006]
<i>RDH12</i>	608830	14q24.1	<i>Retinol dehydrogenase 12</i>	LCA recesiva	[Janecke <i>et al.</i> , 2004; Perrault <i>et al.</i> , 2004]
<i>RPE65</i>	180069	1p31.2	<i>Retinal pigment epithelium-specific 65kD protein</i>	LCA recesiva ARRP	[Marlhens <i>et al.</i> , 1997; Gu <i>et al.</i> , 1997]
<i>RPGRIP1</i>	605446	14q11.2	<i>RP GTPase regulator-interacting protein 1</i>	LCA recesiva	[Dryja <i>et al.</i> , 2001]
<i>TULP1</i>	602280	6p21.31	<i>Tubby-like protein 1</i>	LCA recesiva	[Banerjee <i>et al.</i> , 1998]
<i>Locus LCA3</i>	604232	14q24	-----	LCA recesiva	[Stockton <i>et al.</i> , 1998]
<i>Locus LCA9</i>	608553	1p36	-----	LCA recesiva	[Keen <i>et al.</i> , 2003]

Tabla 1.1. Genes implicados en la LCA

1.3. Genes analizados en este trabajo (Tabla 1.2)

1.3.1. *Aryl hydrocarbon receptor-interacting protein-like 1 (AIPL1)*

AIPL1 [OMIM 604392] se localiza en 17p13.1. La proteína, que pertenece a la familia de las proteínas FK-506-*binding*, tiene una homología del 70% con *AIP* (*hydrocarbon receptor-interacting protein*) por ello se le dio el nombre de *AIP-like 1* (*AIPL1*). Tanto *AIP* como *AIPL1* contienen tres dominios con repeticiones tetratricopéptido, éstas estructuras están presentes en proteínas que participan en diferentes funciones biológicas, desde plegamiento hasta transporte de proteínas, es un dominio de unión proteína-proteína.

Los hallazgos realizados por Ramamurthy *et al.* [2003], sugerían que la función esencial de *AIPL1* en los fotorreceptores requiere la interacción de las proteínas farnesialdas.

Se expresa en los segmentos internos de los fotorreceptores durante el desarrollo de la retina, mientras que en la retina adulta lo hace de forma específica en los bastones [van der Spuy *et al.*, 2003, fig. 1.5]. También se expresa en la glándula pineal.

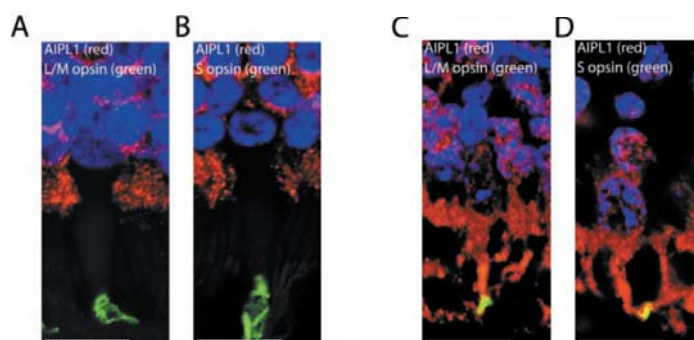


Figura 1.5. Microscopía confocal doble de fluorescencia en retinas de adulto (**A** y **B**) y durante el desarrollo (**C** y **D**). *AIPL1* marcado en rojo y opsinas en verde. Dibujo adaptado de van der Spuy *et al.*, [2003].

Ramamurthy *et al.*, [2004] crearon un modelo animal para el gen *AIPL1*. En la retina del ratón *knockout AIPL1^{-/-}* la capa externa nuclear se desarrolla normalmente, pero los bastones y los conos se degeneran muy rápido. Los autores concluyen que los hallazgos realizados en este modelo de ratón demuestran que *Aipl1* aumenta la estabilidad de la fosfodiesterasa GMPc y es esencial para la viabilidad de los fotorreceptores.

Otros estudios llevados a cabo por Makino *et al.* [2006], analizan la función de *Aip1* y su relación con los niveles de fosfodiesterasa en la fotorrecepción de los bastones de ratón, concluyendo que este gen está afectando directa o indirectamente a otros componentes de la fototransducción.

Las mutaciones en este gen causan distrofia de conos bastones autosómica dominante y LCA [Sohocki *et al.*, 2000 y Hameed *et al.*, 2000]. Supone de un 3 a un 7% de los casos de LCA [Hanein *et al.*, 2004 y Sohoki *et al.*, 2000].

1.3.2. *Centrosomal Protein, 290-KD (CEP290)*

CEP290 [OMIM 610142] también llamado *NPHP6* se localiza en 12q21.3. Codifica para una proteína centrosomal y ciliar [Valente *et al.*, 2006], ver figura 1.6. Su función es mantener intacta la arquitectura de los fotorreceptores así como la lámina interna de los conos de la fovea.

Las mutaciones en el gen *NPHP6/CEP290*, han sido asociadas a Síndrome de Joubert [Valente *et al.*, 2006], síndrome de Senior Locken [Sayer *et al.*, 2006], LCA [den Hollander *et al.*, 2006] y síndrome de Meckel [Baala *et al.*, 2007]. Exceptuando la LCA, el resto de las patologías asociadas tienen presentación sistémica: disfunción renal y problemas en el sistema nervioso entre otros.

La particularidad de la LCA es que todas las familias estudiadas presentan la misma mutación (*CEP290*, 2991+1655A>G) que provoca un error en el corte y empalme de los exones. Al no verse problemas neurológicos ni renales en estos pacientes, se cree que los bajos niveles de transcrito remanente hacen que el único signo clínico asociado a esta mutación sea un fenotipo retiniano agresivo.

Existe un modelo de de ratón, el *rd16*, que presenta una delección que no altera el marco de lectura en *CEP290*. La proteína *CEP290* se localiza en el cilio conector de los fotorreceptores y se asocia con varias proteínas ciliares, incluyéndose *RPGR*. En la retina de los ratones *rd16*, se observa una alteración entre la interacción de *RPGR*

y CEP290 y una redistribución de RPGR y de las proteínas de la fototransducción. Los hallazgos de Chang *et al.*, [2006], sugieren que CEP290 juega un importante papel en el tráfico de proteínas y esto explica la degeneración de los fotorreceptores (Fig. 1.6).

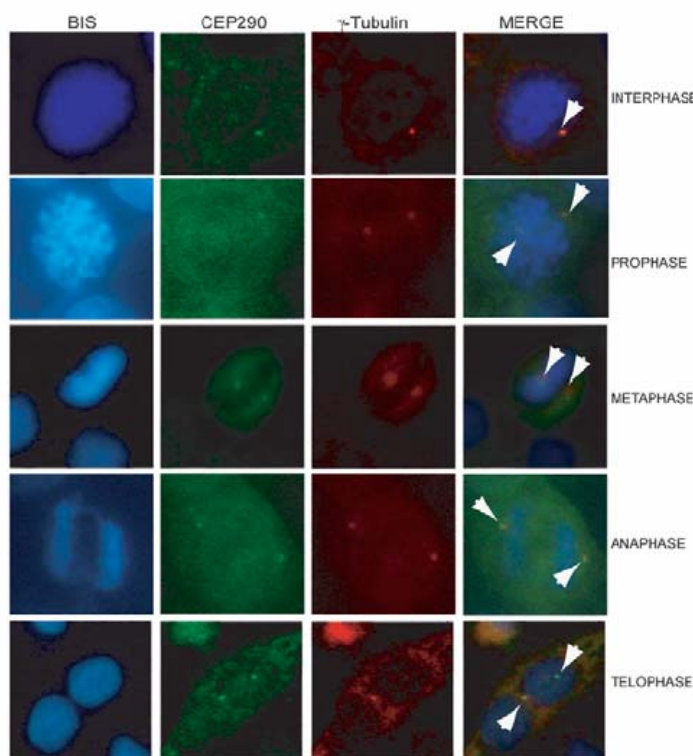


Figura 1.6. Expresión y localización de CEP290 en retina de ratón. CEP290 se asocia con los centrosomas durante el ciclo celular. Células HeLa sincronizadas fueron marcadas con anticuerpos anti γ -tubulina (en rojo) y CEP290 (verde) y estudiadas mediante microscopía confocal. Las flechas indican el marcaje de los centrosomas de CEP290 durante toda la división celular. Adaptado de Chang *et al.*, [2006].

Se ha estimado que la mutaciones en este gen causan de un 8 a un 20% de los casos de LCA dependiendo de la población [den Hollander *et al.*, 2006; Perrault *et al.*, 2007 y Vallespín *et al.*, 2007a].

1.3.3. *Crumbs, Drosophila, Homolog of, 1 (CRB1)*

CRB1 [OMIM 600105] se localiza en 1q31.3. El gen *crumbs* (*crb*) fue identificado inicialmente en *Drosophila* y codifica una proteína transmembrana imprescindible para el mantenimiento de la polaridad celular [Tepass *et al.*, 1990] y a lo largo de la evolución ha mantenido su papel durante el desarrollo embrionario [Tepass, 2002].

La similitud de este gen con CRB (proteína “*Crumbs*”) de *Drosophila* sugiere que tiene un papel fundamental en la interacción célula-célula y posiblemente en el mantenimiento de la polaridad celular en la retina. Juega un importante papel en la morfogénesis de los fotorreceptores [Pellikka *et al*, 2002]. Proponen que es un componente central del *scaffold* que controla el ensamblaje de la *zonula adherens*.

Tiene corte y empalme alternativo que se localiza en el extremo 3' del gen y hay presencia de 4 transcritos (I, II, III y IV) que codifican para cuatro isoformas proteicas. La expresión detectada en retina y cerebro son la I y II, y no se ha visto la expresión de las otras dos, por lo que se cree que pueden tener lugar en los primeros estadios del desarrollo.

CRB1 en humanos tiene dos parálogos, *CRB2* y *CRB3*, que están muy conservados en el reino animal. Modelos animales en *Drosophila* y ratón, han puesto de manifiesto que la pérdida de función de *crb1/CRB1* provocan alteraciones en la morfología y una degeneración inducida por la luz en las células fotorreceptores, estos hechos son comparables a lo que sucede en los pacientes con mutaciones en *CRB1* [Richard *et al.*, 2006], ver figura 1.7.

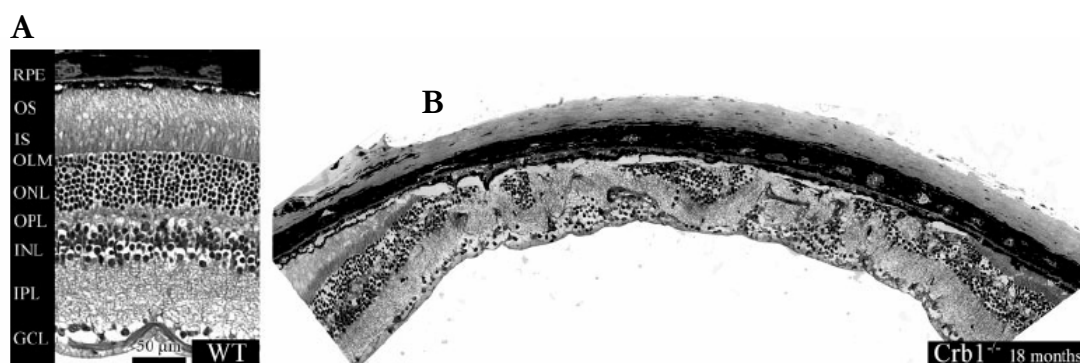


Figura 1.7. Estudio histológico mediante escaneado oftalmológico con láser en ratón *Crb1*^{-/-}. (A) Retina silvestre que no muestra anormalidades. (B) Retina *Crb1*^{-/-} a los 18 meses, se ven grandes zonas de degeneración de los fotorreceptores y una pérdida de la organización de la capa neural interna. Esquema adaptado de van der Pavert *et al.* [2007].

La proteína está constituida por un largo dominio extracelular compuesto por *epidermal grow factor* (*EGF-like*), (algunos de los cuáles pueden unir calcio), así como por dominios de lámina G. En mamíferos la estructura proteínica se mantiene muy conservada entre todas las especies. Existen diferentes transcritos de *CRB1*. Este

gen consta de un pequeño dominio intracelular llamado complejo *CRB1/crb* que se localiza en la zona apical de la “*zonula adherens*” en células de origen epitelial, muchos estudios confirman su importancia en el mantenimiento de la polaridad celular [Wodarz *et al.*, 1995; Knust *et al.*, 2002; Roh *et al.*, 2003; Straight *et al.*, 2004 y Michel *et al.*, 2005] así como en su papel en la morfogénesis o el mantenimiento de la retina.

El extremo C-terminal, que está perfectamente conservado en vertebrados (Fig. 1.8, A). Su unión a un complejo de proteína (Fig. 1.8, B) es fundamental para el desarrollo de la retina. El complejo *CRB1/crb* no es estático y sus interacciones varían en base al tipo celular o al estadio de desarrollo [Richard *et al.*, 2006].

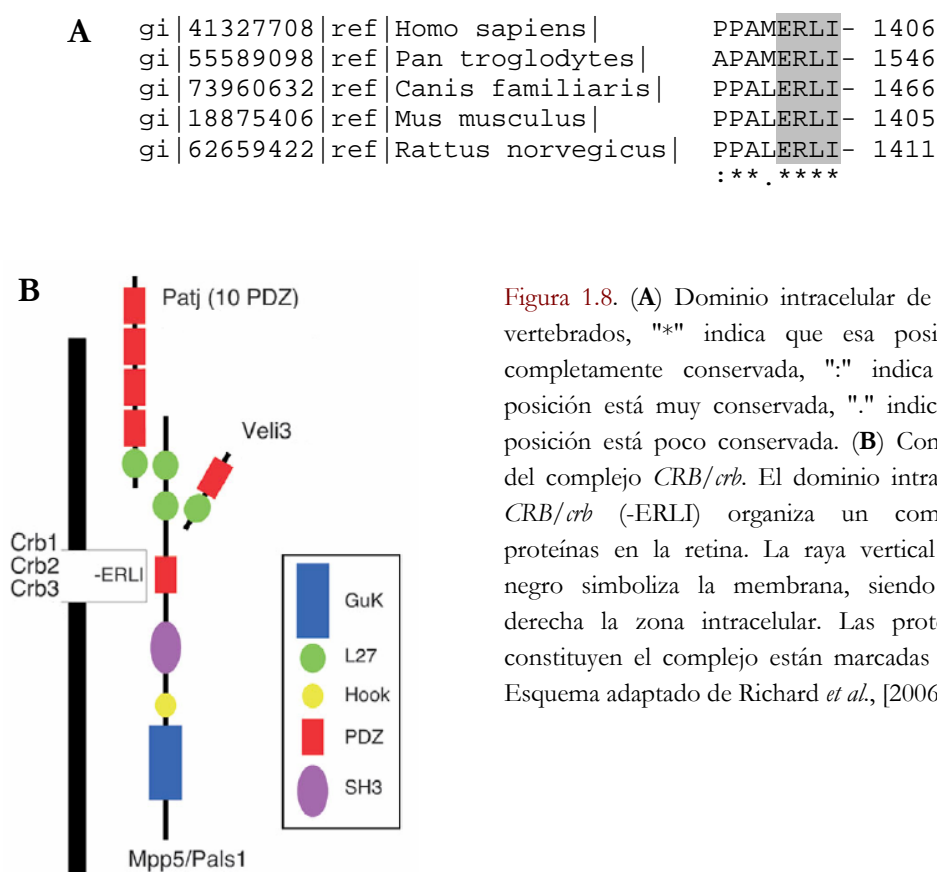


Figura 1.8. (A) Dominio intracelular de CRB1 en vertebrados, "*" indica que esa posición está completamente conservada, ":" indica que esa posición está muy conservada, "." indica que esa posición está poco conservada. (B) Componentes del complejo *CRB/crb*. El dominio intracelular de *CRB/crb* (-ERLI) organiza un complejo de proteínas en la retina. La raya vertical de color negro simboliza la membrana, siendo la parte derecha la zona intracelular. Las proteínas que constituyen el complejo están marcadas en negro. Esquema adaptado de Richard *et al.*, [2006].

Hay dos modelos de ratón para CRB1, el primero es el llamado *rd8*, que es un mutante espontáneo con una deleción que causa una alteración en el marco de lectura de la proteína y por lo tanto un codón temprano de parada. La proteína que se secreta no tiene los dominios transmembrana y citoplasmático. Las retinas de

estos ratones muestran un punteado blanquecino en el cuadrante nasal inferior a la edad de 3 semanas. Los análisis morfológicos muestran una alteración en la “*zonula adherens*” de la membrana externa, así como una desorganización de los segmentos internos y externos y un acortamiento del 25% de los segmentos internos. El fenotipo observado varía notablemente si se cruzan ratones *rd8* de cepas diferentes, lo que sugiere un importante papel de otros genes que actúan como modificadores [Mehalow *et al.*, 2003].

El segundo modelo es un ratón *knockout*, *Crb1*^{-/-} generado por la delección del promotor y el primer exón. El desarrollo da lugar a una degeneración retiniana donde la integridad de la membrana externa se ve comprometida. La exposición de estos ratones a la luz, incrementa significativamente la cantidad y el tamaño de la degeneración que se manifiesta en el FO como puntos blanquecinos [van de Pavert *et al.*, 2004]. Estudios más recientes llevado a cabo por este mismo grupo [van de Pavert *et al.*, 2007] proponen que la desestructuración de la retina en los mutantes es una consecuencia de la pérdida de Crb1 en las células de Müller, que provoca tanto un número como un tamaño irregular de los *villi*. Ya que postulan que Crb1 es requerido para regular el número y el tamaño de los *villi* con la consiguiente pérdida de integridad en la retina.

Estos modelos son fundamentales para caracterizar el complejo proteínico donde las diferentes proteínas *Crb* están implicadas. Esto serviría para desentrañar el mecanismo que provoca la degeneración de los fotorreceptores ante la falta de *CRB1* y así poder desarrollar una posible terapia [Meuleman *et al.*, 2004].

Las mutaciones en este gen dan lugar a un amplio espectro de distrofias de retina, que incluye RP [Den Hollander *et al.*, 1999], RP con vasculopatía exudativa tipo *Coats* [Den Hollander *et al.*, 2001] y LCA [Den Hollander *et al.*, 2001; Gerber *et al.*, 2002; Khaliq *et al.*, 2003; Lotery *et al.*, 2001].

Las mutaciones en *CRB1* suponen de un 9 a un 13% de los casos de LCA [Lotery *et al.*, 2001 y Den Hollander *et al.*, 2001].

1.3.4. *Cone-rod homeobox-containing gene (CRX)*

CRX [OMIM 60225] se localiza en 19q13.3. El gen *CRX* codifica un factor de transcripción de la rodopsina y es esencial tanto para el tropismo como para el desarrollo precoz de los fotorreceptores [Furukawa *et al.*, 1997]. Los conos y los bastones en la retina de mamíferos son los responsables de la fototransducción en el primer paso de la visión. El desarrollo y el mantenimiento de los fotorreceptores requieren una expresión génica muy regulada. Esta regulación está mediada por una red de factores de transcripción centrados en *CRX* y el factor de transcripción homeodominio *OTX-like*. Esta regulación se lleva a cabo mediante la interacción con las regiones Ret-4 y BAT-1 localizadas en la región RPPR del promotor del gen de la rodopsina [Chen *et al.*, 1997].

CRX juega un papel fundamental en el desarrollo y parece ser que es importante para mantener el fenotipo de estas células, ya que se expresa también en la glándula pineal adulta [Rath *et al.*, 2006].

Estudios animales: En el estudio de ratones *knockout* con mutaciones en el gen *Crx*, se observó que aquellos que eran homocigotos para la mutación carecían de función fotorreceptora por lo que nacían ciegos, sin embargo aquellos que eran heterocigotos presentaban una función fotorreceptora normal hasta los tres meses de vida [Furukawa *et al.*, 1999].

Bibb *et al.*, [2001], estudiaron la expresión de *CRX* durante el desarrollo embrionario, y vieron que se expresaba en la semana 10,5 tras la concepción, este dato difería mucho del obtenido en ratón, donde la expresión era mucho más temprana.

El gen *CRX* interacciona con numerosas proteínas. Éstas incluyen, entre otras, factores de transcripción *NRL* [Mitton *et al.*, 2000], *NR2E3* [Mears *et al.*, 2001] y *QRX* [Wang *et al.*, 2004] y factores de remodelación *ATAXIN-7* [La Spada *et al.*, 2001].

Las mutaciones en este gen se han asociado a LCA recesiva, como algún caso dominante [Freund *et al.* 1998; Sohocki *et al.* 1998], distrofia de conos bastones dominante tipo 2 (DCB2) [Freund *et al.* 1997; Swain *et al.* 1997] y ADRP [Sohocki *et al.* 1998]. El 2% de los casos de LCA son debidos a mutaciones en el gen *CRX* [Lotery *et al.*, 2001].

1.3.5. *Guanylate Cyclase 2D, Membrane (GUCY2D)*

GUCY2D [OMIM 600179] se localiza en 17q13.1. El gen *GUCY2D* codifica la proteína RetGC-1, guanilato ciclasa, que es una enzima específica de fotorreceptores que participa en la recuperación de la cascada de la fototransducción.

Cuando los conos y los bastones se excitan mediante la rodopsina fotorreactiva estimulan la fosfodiesterasa unida al GMP cíclico (GMPc), determinado de esta forma la hidrólisis del GMPc y el cierre de los canales dependientes de GMPc. Este proceso lleva a la hiperpolarización de la membrana por la detención de la entrada de calcio a través de los canales mencionados anteriormente. El nivel citosólico de calcio disminuye estimulando la producción de guanilatociclasa que, sintetizando GMP cíclico, permite la reapertura de los canales de calcio.

En la LCA, la producción de GMPc está abolida, lo que compromete el proceso de excitación de los fotorreceptores. En la retina, los fotorreceptores convierten la energía luminosa en señales eléctricas, mediante el proceso de transducción que utiliza una cascada enzimática. El GMPc no puede alcanzar de nuevo los niveles de oscuridad, lo que equivale a una situación de exposición continua a la luz durante el periodo en el que se desarrollan los fotorreceptores.

Las mutaciones en este gen dan lugar a LCA [Perrault *et al.*, 1996] y distrofia de conos bastones (DCB) dominante [Kelsell *et al.*, 1997]. Se ha descrito que entre un 6 y un 20% de los casos de LCA son debidos a mutaciones en *GUCY2D* [Lotery *et al.*, 2000 y Perrault *et al.*, 2000].

1.3.6. Retinol Dehydrogenase 12 (RDH12)

RDH12 [OMIM 608830] se localiza en 14q24.1. Los retinoides son elementos sensibles a la luz, indispensables para la visión e importantes moduladores de diferenciación y proliferación celular de diversos tipos celulares. El ciclo visual consiste en una serie de reacciones enzimáticas y mecanismos de transporte relacionados con el metabolismo de la vitamina A, necesaria para mantener la respuesta a la luz en la retina de vertebrados (Fig. 1.9).

RDH12 pertenece a la familia de las retinol-deshidrogenasas las cuales metabolizan *all*, *trans* y *cis*-retinol [Haeseleer *et al.*, 2002]. En el análisis realizado por Haeseleer *et al.* [2002], parece que las enzimas catalizan en ambos sentidos (NADPH/retinal--NADP/retinol).

RDH12 se expresa predominantemente en ojo, también lo hace en riñón, cerebro, músculo esquelético y estómago. Se ha visto en monos y ratones que *RDH12* se expresa en la base de los segmentos internos de fotorreceptores [Haeseleer *et al.*, 2002].

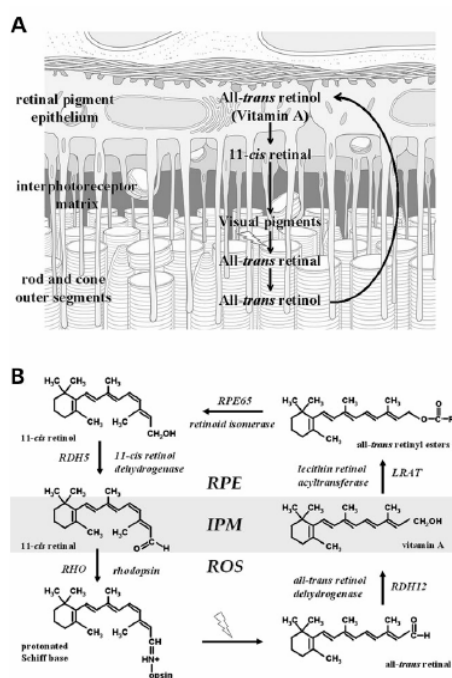


Figura 1.9. Esquema de las reacciones del ciclo visual (A) interconversión de la vitamina A y 11-*cis* retinal y (B) proteínas y enzimas (junto a sus correspondientes genes) y retinoides presentes en los fotorreceptores y epitelio pigmentario. IMP: Matriz interfotorreceptores, ROS: segmento externo de los bastones. Esquema adaptado de Thompson *et al.*, [2005].

Las mutaciones en *RDH12* causan el 4% de los casos de LCA [Janecke *et al.*, 2004 y Perrault *et al.*, 2004].

1.3.7. *Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator-Interacting Protein (RPGRIP1)*

RPGRIP1 [OMIM 605446] se localiza en 14q11.2. *RPGRIP1* es una proteína que interacciona con *RPGR*, gen regulador de la GTPasa responsable de Retinosis Pigmentaria ligada al cromosoma X. *RPGRIP1* y *RPGR* colocalizan en el segmento externo de los fotorreceptores. *RPGRIP1* se expresa en retina y débilmente en testículos, hipotálamo, riñón, hígado y bazo.

En 2001 Hong *et al.* observaron que *RPGRIP1* es un componente estructural del axonema ciliar.

A su vez, las mutaciones tanto en *RPGRIP1* como en *NPHP4*, asociado en el síndrome de Senior-Locken tipo 4 [OMIM 606996] alteran la interacción entre ambas proteínas. Mutaciones en este gen dan lugar a LCA [Dryja *et al.*, 2001].

Modelos animales: Zhao *et al.*, 2003 crearon un ratón *knockout* para *RPGRIP1* (*RPGRIP1*^{-/-}) llegando a la conclusión de que este gen en ratones es estable en el cilio conector de los fotorreceptores y un anclaje para *RPGR*. *RPGRIP1* es necesario para la morfogénesis de los discos en el ratón, quizá mediante la regulación de la dinámica del citoesqueleto.

Se ha observado que las mutaciones en este gen causan de un 4 a un 6% de los casos de LCA [Gerber *et al.*, 2001 y Dryja *et al.* 2001].

Gen	Expresión	Tipo molecular	Proceso biológico	Localización	Interacción	Referencia
AIPL1	Glándula pineal y retina	Actividad chaperona	Plegamiento de proteínas, percepción sensorial y visual	Segmento interno de los fotorreceptores.	<i>NUB1</i> [607981]	Hameed <i>et al.</i> , 2000; Hanein <i>et al.</i> , 2004; Sohocki <i>et al.</i> , 1999; Sohocki <i>et al.</i> , 2000; van der Spuy <i>et al.</i> , 2002
CEP290	Riñón, ovario, timo, próstata, testículo, placenta y cerebro.	Transportador de proteínas	Mantener la arquitectura de los fotorreceptores.	Cilio conector y centrosoma	<i>ATF4</i> [604064] <i>RPGR</i> [312610]	Chang <i>et al.</i> , 2006; den Hollander <i>et al.</i> , 2006; Sayer <i>et al.</i> 2006; Valente <i>et al.</i> , 2006
CRB1	Cerebro y retina	Actividad estructural	Adhesión celular, señal célula-célula, establecimiento y/o mantenimiento de la polaridad celular, percepción sensorial y visual	Adyacente a la <i>zonula adherens</i> de los segmentos internos de los conos y los bastones y en el segmento externo de la membrana plasmática de los conos	<i>MPP5</i> [606958] <i>PATJ</i> [603199]	den Hollander <i>et al.</i> , 1999a; den Hollander <i>et al.</i> , 2001; Hanein <i>et al.</i> , 2004; Heckenlively <i>et al.</i> , 1982; Jacobson <i>et al.</i> , 2003; Leutelt <i>et al.</i> , 1995; Lotery <i>et al.</i> , 2001; Lotery <i>et al.</i> , 2001a; McKay <i>et al.</i> , 2005; van Soest <i>et al.</i> , 1994
CRX	Glándula pineal y retina	Factor de transcripción	Organogénesis, regulador de la transcripción, percepción sensorial y visual	Núcleo	<i>NRL</i> [162080] <i>NR2E3</i> [604485] <i>QRX</i> [610362] <i>ATXN7</i> [607640]	Bellingham <i>et al.</i> , 1997; Evans <i>et al.</i> , 1994; Evans <i>et al.</i> , 1995; Freund <i>et al.</i> , 1997; Freund <i>et al.</i> , 1998; Furukawa <i>et al.</i> , 1999; Gregory <i>et al.</i> , 1994; Hanein <i>et al.</i> , 2004; Li <i>et al.</i> , 1998; Lotery <i>et al.</i> , 2000; Sohocki <i>et al.</i> , 1998; Swain <i>et al.</i> , 1997; Swaroop <i>et al.</i> , 1999
RPGRIP1	Retina y testículo	Desconocida	Percepción sensorial y visual	Cilio conector	<i>RPGR</i> [312610] <i>NPHP4</i> [607215]	Boylan <i>et al.</i> , 2000; Dryja <i>et al.</i> , 2001; Hanein <i>et al.</i> , 2004; Hong <i>et al.</i> , 2001; Mavlyutov <i>et al.</i> , 2002; Mellersh <i>et al.</i> , 2006; Roepman <i>et al.</i> , 2000
GUCY2D	Glándula pineal, retina	Guanilato ciclasa	Receptor, biosíntesis de cGMP, cascada de señalización intracelular, fosforilación proteínica, ruta metabólica del receptor de la guanilil ciclasa, percepción sensorial y visual	Integrado en la membrana plasmática y en la membrana del segmento externo	-----	Camuzat <i>et al.</i> , 1995; Camuzat <i>et al.</i> , 1996; Hanein <i>et al.</i> , 2004; Kelsell <i>et al.</i> , 1997; Kelsell <i>et al.</i> , 1998a; Lotery <i>et al.</i> , 2000; Payne <i>et al.</i> , 2001; Perrault <i>et al.</i> , 1996; Perrault <i>et al.</i> , 1998; Semple-Rowland <i>et al.</i> , 1998; Williams <i>et al.</i> , 2006
RDH12	Cerebro, retina, riñón, músculo esquelético, estómago.	Actividad oxidorreductasa, actividad retinol deshidrogenasa	Metabolismo, mantenimiento del fotorreceptor, metabolismo del retinol, percepción sensorial y visual	Espacio intracelular	<i>CRBP1</i> [180260] <i>CRALBP</i> [18009]	Haeseleer <i>et al.</i> , 2002; Janecke <i>et al.</i> , 2004; Perrault <i>et al.</i> , 2004

Tabla 1.2. Genes implicados en LCA estudiados en este trabajo.

1.4. Futuro de la RP

Existen diversas líneas de investigación relacionadas con las perspectivas terapéuticas que, no obstante, dependen directamente de los adelantos en el conocimiento del origen de este tipo de enfermedades.

Hasta el momento se han desarrollado diferentes proyectos de investigación para la búsqueda de posibles terapias como la terapia farmacológica donde se conocen algunos fármacos que nutren los fotorreceptores o que facilitan su función.

Una de las primeras terapias llevadas a cabo en los modelos con distrofias de retina fue con el ratón *rd*, al cual, le falta la enzima responsable de la fototransducción en los bastones, la fosfodiesterasa cGMP (*PDE6B*). [Lem *et al.*, 1992] mostraron que era posible el rescate de los fotorreceptores por una introducción transgénica del gen normal gracias a una inyección subretinal en un embrión de ratón de 1 día de edad. Es importante saber que a esa edad los fotorreceptores se están aún dividiendo y no han sufrido una degeneración completa.

A su vez, Travis *et al.*, [1992] mostraron un rescate parecido al anterior. Fue en un ratón al que le faltaba la proteína estructural *RDS/Periferina* de los fotorreceptores. Ambos genes (*bPDE* y *RDS*) fueron reintroducidos en los modelos de ratón antes de que el proceso degenerativo hubiera tenido lugar del todo, pero mientras la división celular era activa. La cuestión surge al plantearse si es posible remplazar genes en un estado tardío de la degeneración, cuando los segmentos externos se han perdido debido a la degeneración retiniana.

[Ali *et al.*, 2000] llevaron a cabo inyecciones subretinales con virus asociado a adenovirus (AAV) recombinantes, que contenían el gen normal *RDS/Periferina* en el ratón *rd* que padecía a una degeneración retinal. Una inyección posterior con inmuno-marcaje reveló una periferina normal y la localización de la rodopsina en los segmentos externos de los fotorreceptores, que mostraban, por lo tanto, una expresión satisfactoria del gen introducido en la correcta capa de la retina. Los segmentos externos de los fotorreceptores y los discos apilados eran muy similares a

los de los ratones de fenotipo silvestre y muy diferentes a los del ratón *rd*. Los estudios funcionales mostraron una mejora en el electroretinograma de los animales tratados.

También se están desarrollando otra serie de tratamientos como cápsulas intraoculares, las cuales dejan salir el fármaco lentamente, de modo que retardan la degeneración de los fotorreceptores. Otros como el implante retinal, ya que en algunos casos en la retina quedan algunas células que pueden servir como plataforma para el implante de los microchip.

En la LCA hay varias líneas de investigación donde la más destacada es la que se ha llevado en el gen *RPE65* [Acland *et al.*, 2001] que se trata de un modelo canino de tratamiento de la LCA mediante terapia génica con el vector rAAV-*RPE65*. El tratamiento es efectivo tras un seguimiento de más de 5 años. Restaurándose la respuesta retinal y visual en animales tratados y sienten bien tolerado el vector, sin inflamación intraocular.

Actualmente se está desarrollando la fase I en humanos, que comenzó a finales de 2005, pero no se han publicado aún estos resultados.

Hay tres aspectos importantes que se pueden destacar de la sustitución del gen *RPE65* que han podido favorecer el éxito de la terapia, 1) *RPE65* es un gen que se expresa en la capa del epitelio pigmentario de la retina y en los conos, 2) *RPE65* codifica una enzima (no una proteína estructural) y 3) la arquitectura retinal de *RPE65* en el perro no estaba completamente degenerada. La cuestión ahora es, ¿se podría restituir la función de los genes que codifiquen proteínas estructurales cuando el proceso degenerativo ya haya tenido lugar? Pawlyk *et al.* [2005] usaron el modelo de ratón *knockout* para *RPGRIP1* para responder a esta pregunta. *RPGRIP1* se expresa en el axonema ciliar que conecta el segmento interno del fotorreceptor con el externo. Las mutaciones en este gen, dan lugar a problemas en el tráfico de proteínas desde el segmento interno hasta el externo, morfogénesis imperfecta en los discos de los segmentos internos y una rápida degeneración de toda la retina. Cinco meses después de la inyección de cDNA *RPGRIP1* con un vector AAV, se observó que tanto a *RPGRIP1*, como *RPGR*, estaban correctamente localizados en

el cilio conector y hay una preservación del núcleo del fotorreceptor en la membrana nuclear externa. El ERG muestra una importante mejoría.

En el caso del gen *CRB1*, cuyos resultados en población española destacan sobre el resto del mundo [Vallespín *et al.*, 2007d] se ha visto que la pérdida de función da lugar a una desestructuración de la retina y una degeneración inducida por la luz. La inserción de *CRB1* en la red de las células de Müller representa una posible diana terapéutica como se ha visto mediante el uso de *CRB1* humano en la región subapical en retinas de ratones *CRB1*^{-/-} [Richard *et al.*, 2006].

Los tratamientos celulares y genéticos encabezan el avance en los abordajes contra las distrofias retinianas. El futuro pasa también por la combinación de terapias para un mismo paciente.

1.5. Ventajas y aplicaciones del estudio genético en LCA y RP-IP

La identificación del defecto molecular subyacente permitirá mejorar el diagnóstico precoz y el pronóstico de los pacientes.

La evaluación clínica (fenotipo) y molecular (genotipo) de los pacientes y agiliza su correcto diagnóstico, identificando otros defectos los casos sindrómicos o evitando exploraciones innecesarias en casos no complicados. En algunos casos, establecer el genotipo ayuda también a predecir el pronóstico visual del paciente.

Además dado que la enfermedad se manifiesta muy precozmente, muchas familias desean recibir consejo genético y prevenir la enfermedad mediante el diagnóstico prenatal o pre-implantatorio.

Por último, en un futuro no muy lejano, el diagnóstico molecular será fundamental para seleccionar pacientes para terapias específicas.



“La Gran Vía”

Antonio López García, 1974 – 1981

OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Este estudio pretende profundizar en las bases genéticas y moleculares de la LCA y RP-IP, identificando y caracterizando las mutaciones y genes responsables, así como los posibles factores modificadores y los mecanismos genéticos no mendelianos (trialelismo y digenismo) que subyacen a estas patologías.

2.2. Objetivos específicos

1. Estudiar el papel etiológico de los cambios en genes responsables de LCA, en familias españolas con LCA y RP-IP.
2. Desarrollar una metodología específica de estudio molecular en LCA y RP-IP como algoritmo para el diagnóstico de rutina.
3. Estudiar las familias con herencia no mendeliana en LCA y RP-IP: trialelismo y digenismo.
4. Establecer una correlación genotipo-fenotipo en familias con mutaciones en *CRB1*, *CEP290* y *RDH12*.
5. Desarrollar una herramienta bioinformática para el correcto manejo de los datos tanto clínicos como genéticos de los pacientes y sus familiares.



“Los acuchilladores del parqué”
Gustave Caillebotte, 1875

PACIENTES Y MÉTODOS

Con el propósito de no hacer excesivamente extenso el apartado de *Pacientes y Métodos*, se expondrán de forma breve las técnicas más convencionales así como los protocolos que se van a seguir, mientras que se detallarán las técnicas/metodologías más novedosas o diseñadas por el autor.

3.1. Pacientes

3.1.1. Criterio de inclusión

La clasificación se realizó de acuerdo con los criterios previamente establecidos por Ayuso *et al.*, [1995]. Todas las familias que han participado en este estudio cumplían los criterios tanto genéticos como clínicos.

3.1.1.1. Criterio clínico

Se incluyeron en este estudio las familias con afectos que presentaban los rasgos clínicos establecidos para LCA y RP-IP que se muestran en la tabla 3.1.

3.1.1.2. Criterio genético

Este trabajo se va a referir exclusivamente a las formas autosómicas recesivas y esporádicas. Se consideran familias con herencia autosómica recesiva las que presentan más de un afecto en una misma fratría y aquellos casos con un sólo afecto pero cuyos padres son consanguíneos.

3.1.1.3. Consentimiento informado

Todos los pacientes estudiados leyeron y firmaron el Consentimiento Informado que se adjunta en el Anexo I que permite el estudio y el almacenaje de su muestra de ADN, así como la cesión de sus datos de forma disociada a la Red Europea de Distrofias de Retina (EVI-GENORET).

Amaurosis congénita de Leber

Ceguera congénita o presente antes de los 6 meses de vida

Nistagmo

Electrorretinograma abolido

Reacción pupilar lenta

Signo óculo-digital (signo de Franceschetti)*

Potenciales evocados abolidos o reducidos

Fondo de ojo variable (normal, sal y pimienta...)

Retinosis Pigmentaria de Inicio Precoz

Inicio antes de los 10 años de vida pero no congénito

ERG abolido después del primer año de vida

Agudeza visual central $> 1/10$

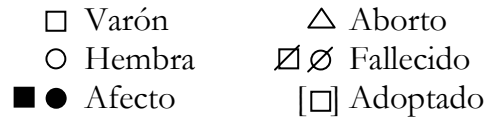
No nistagmo

Tabla 3.1. Criterios clínicos para la LCA [De Laey, 1991].

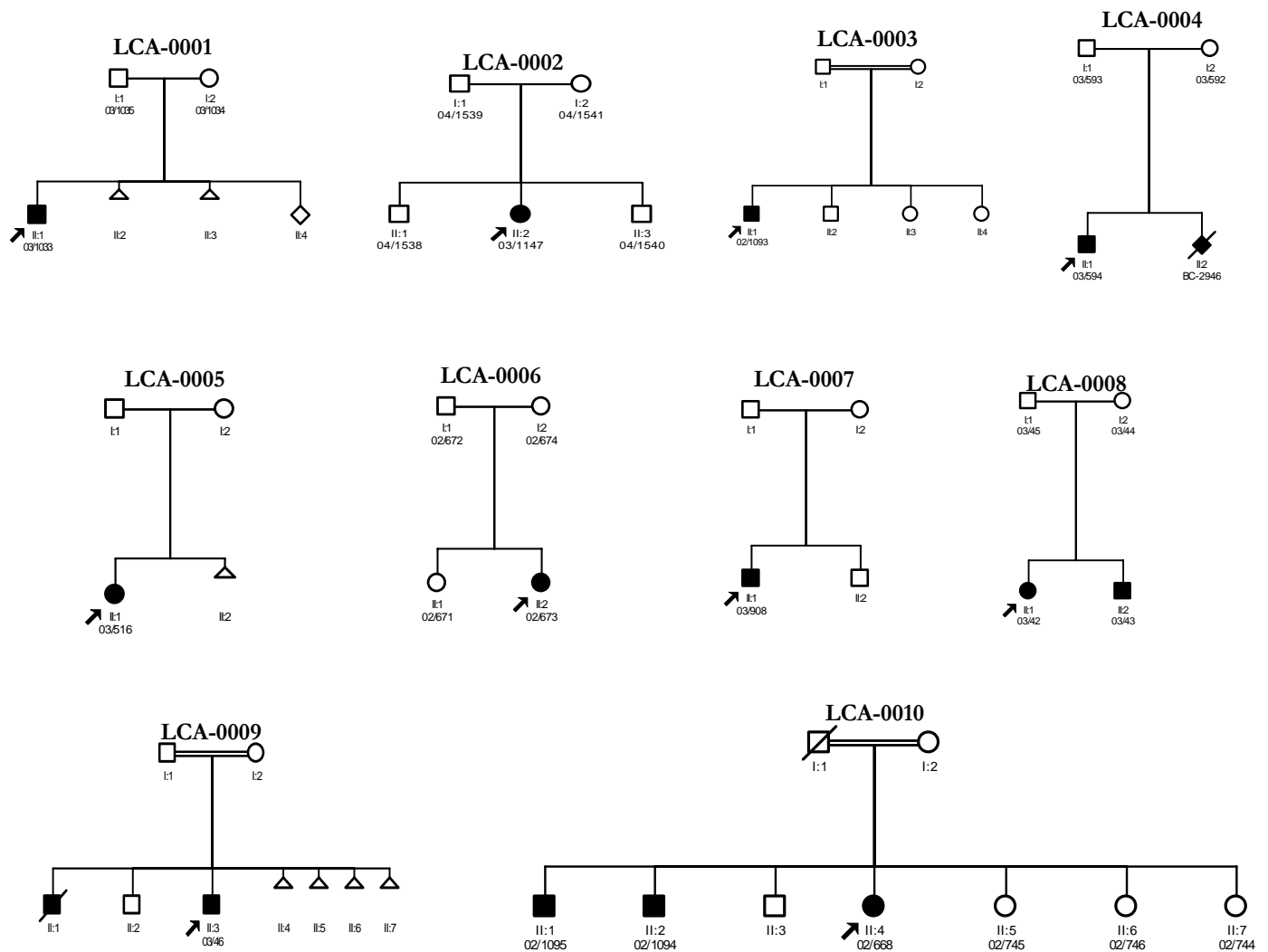
* El signo óculo digital, también llamado signo de Franceschetti a menudo se considera patognomónico. Este comportamiento puede producir daños en el globo ocular causando enoftalmos, keratocono e infecciones.

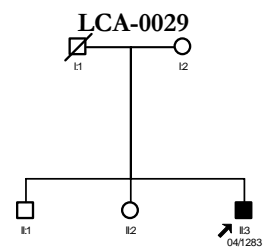
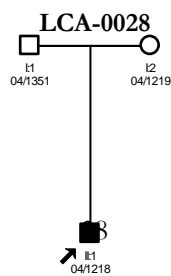
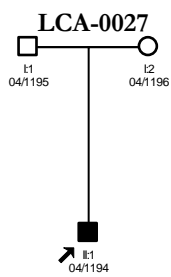
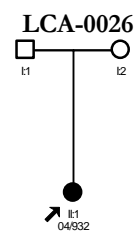
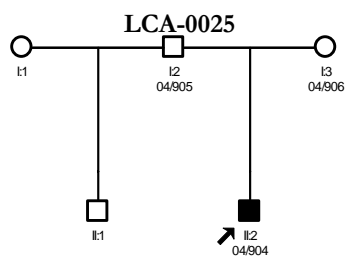
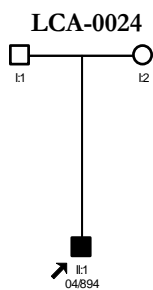
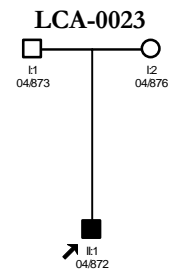
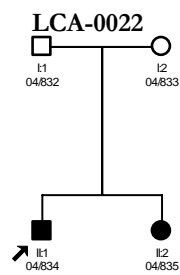
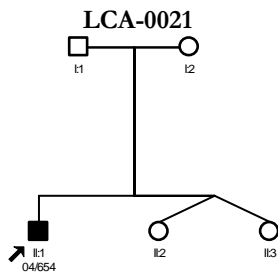
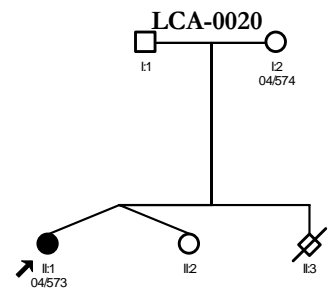
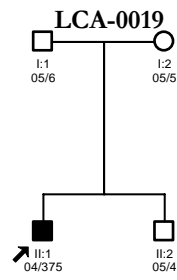
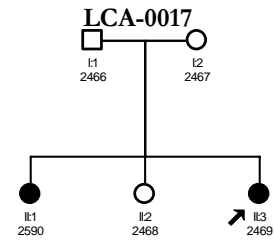
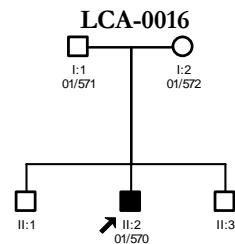
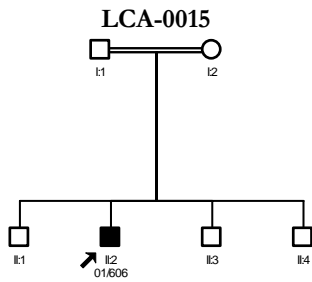
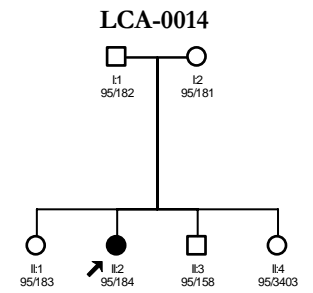
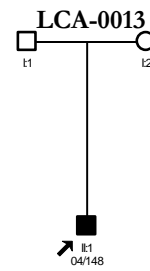
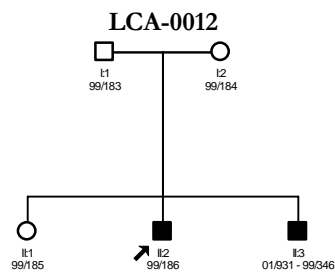
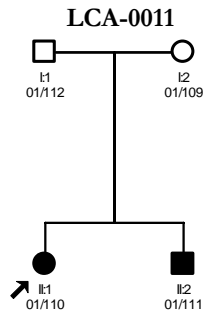
3.1.2. Número de familias estudiadas

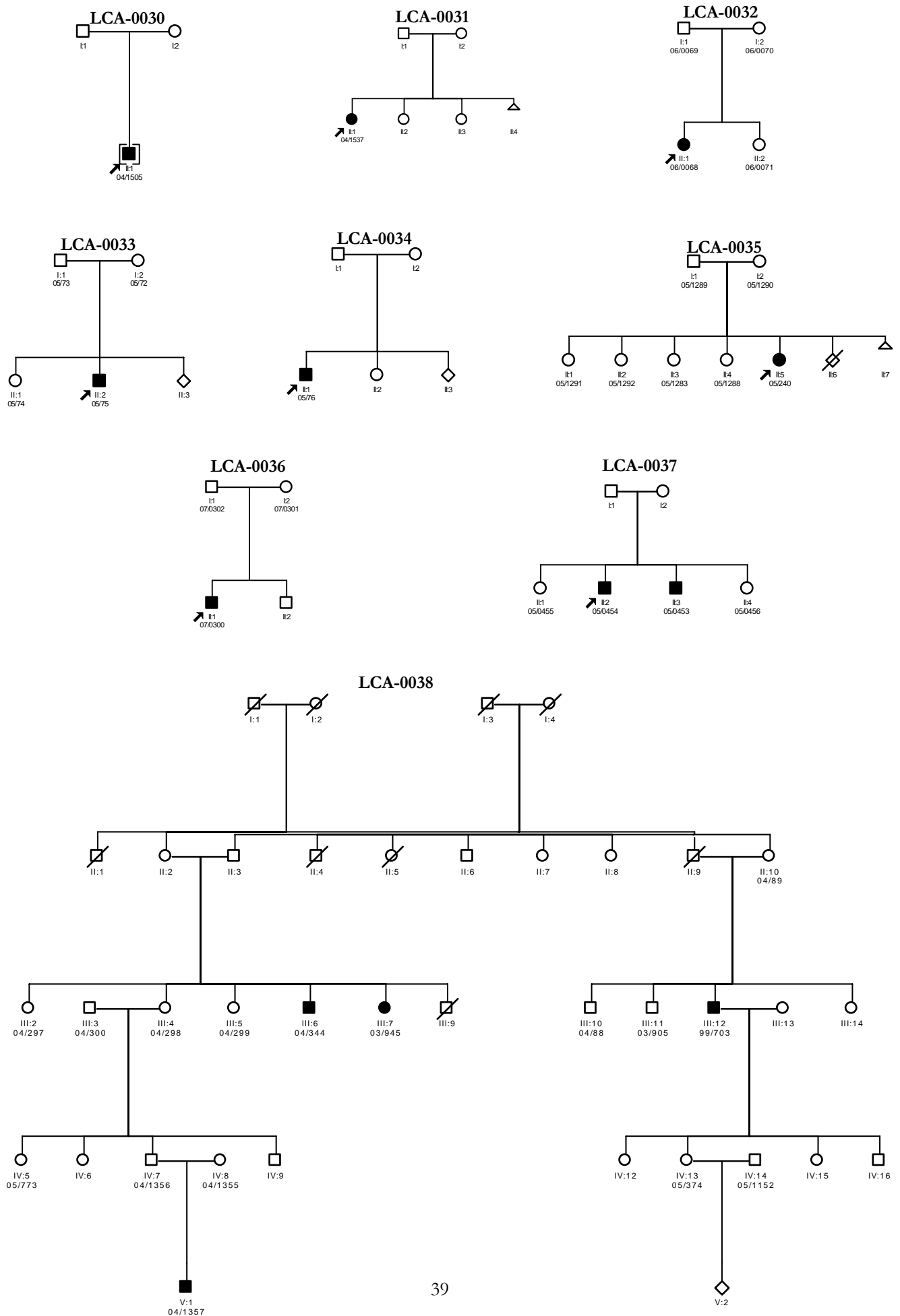
Se han estudiado un total de 177 familias no relacionadas entre sí, clasificadas en dos grupos según su diagnóstico clínico: 49 familias con Amaurosis congénita de Leber (LCA) y 128 familias con Retinosis Pigmentaria Inicio Precoz (RP-IP). A continuación se representan las familias de este trabajo, siendo:

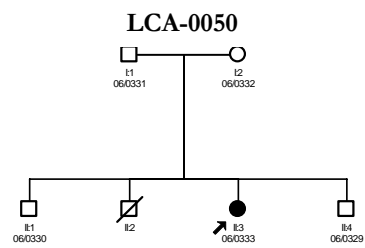
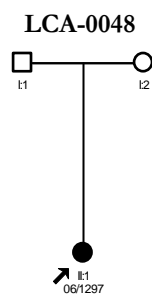
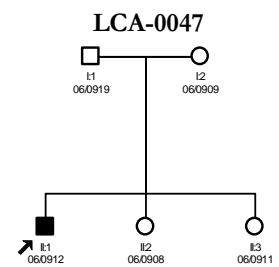
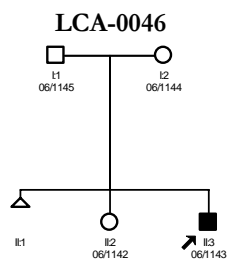
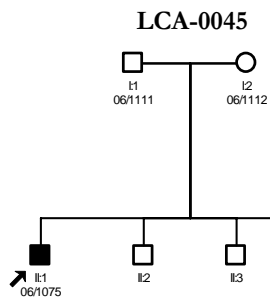
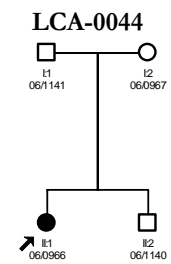
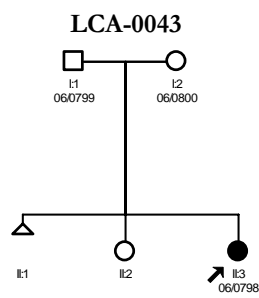
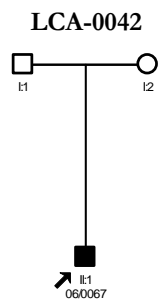
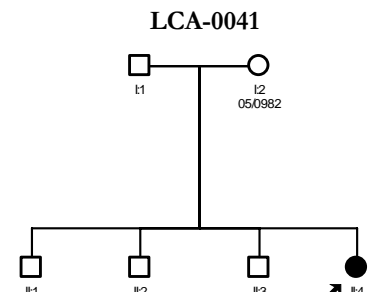
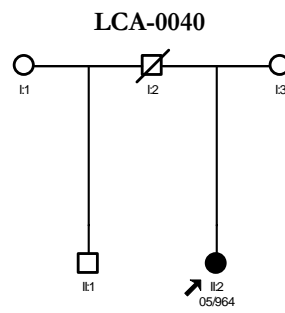
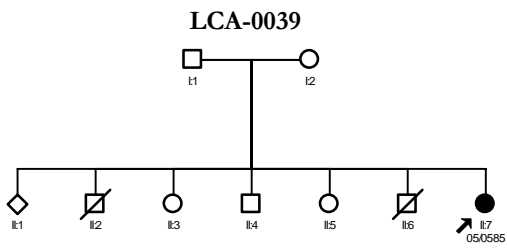


3.1.2.1. 49 familias LCA

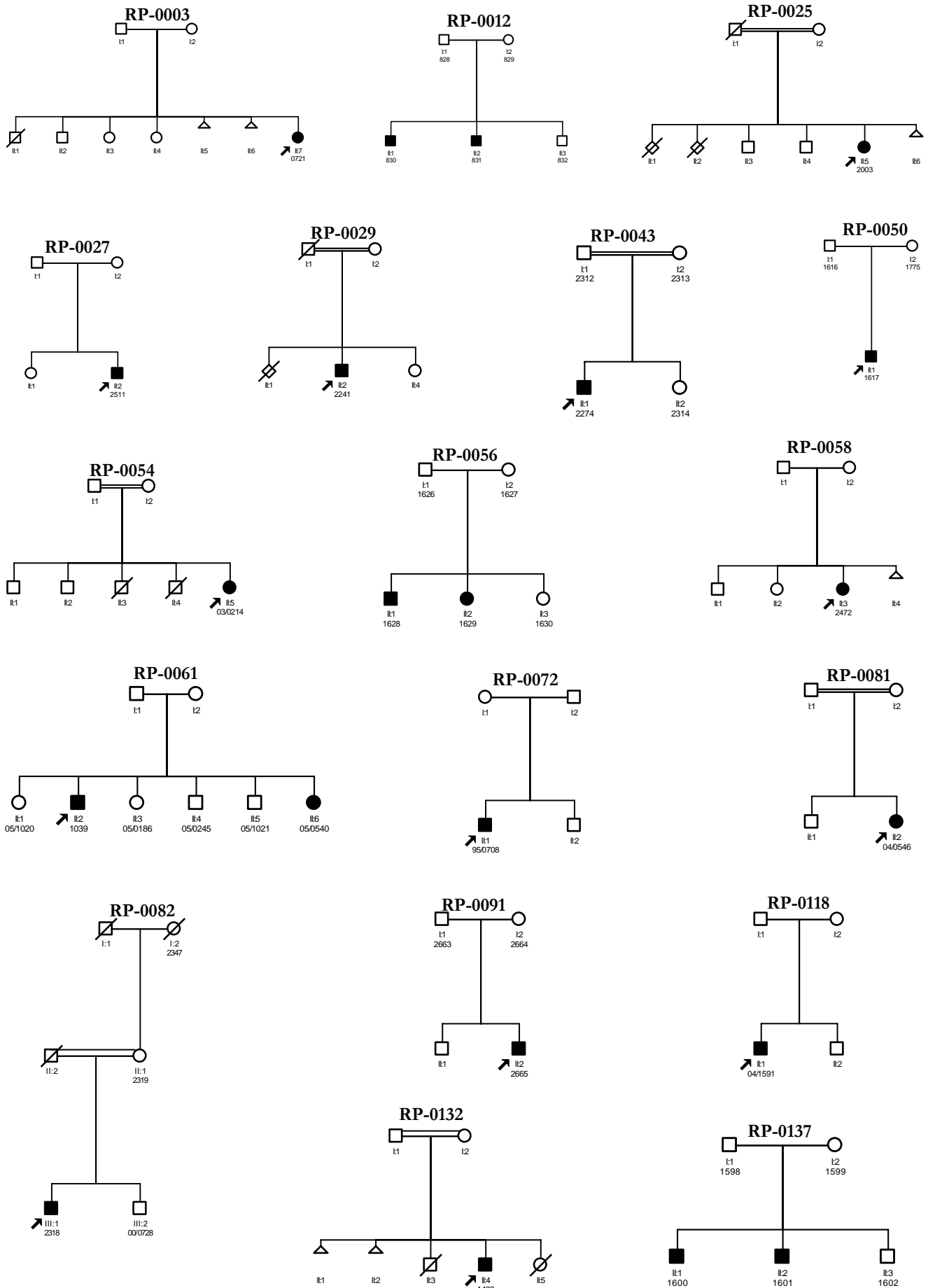


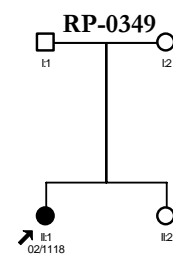
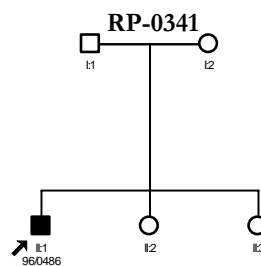
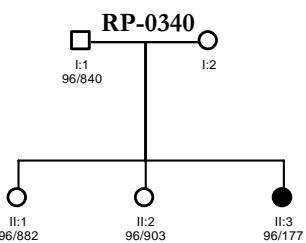
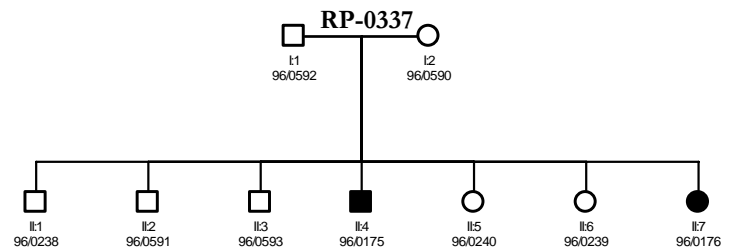
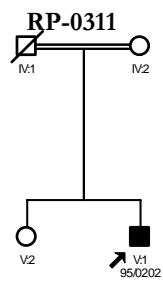
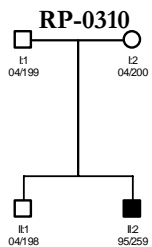
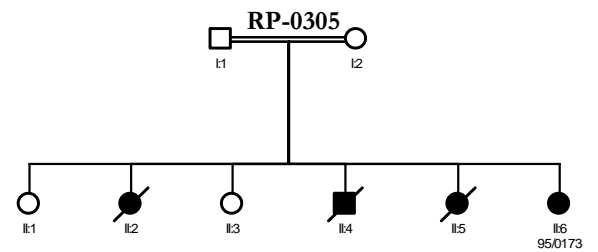
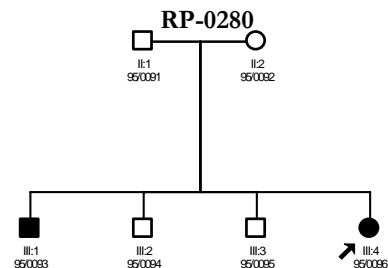
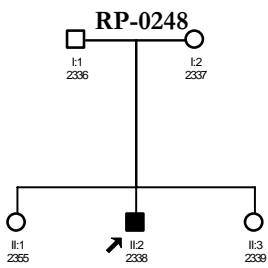
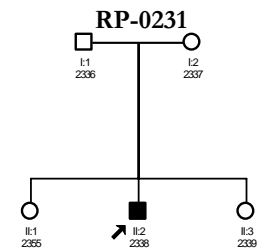
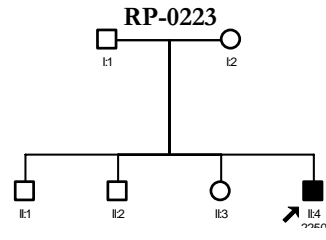
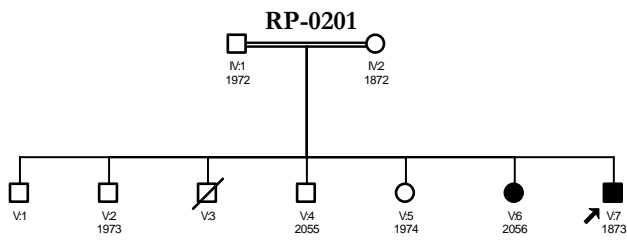
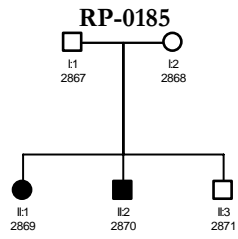
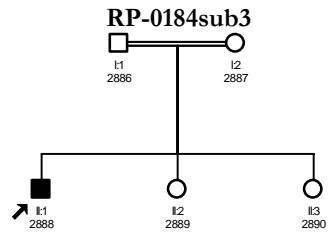
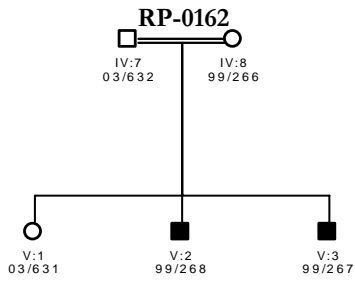
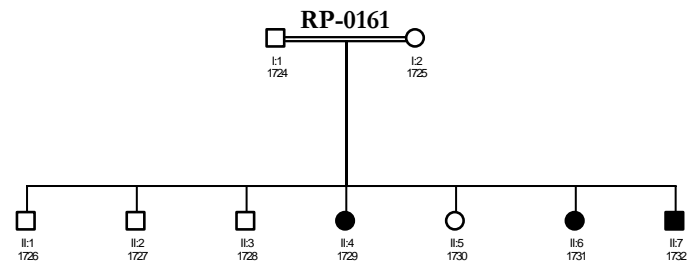
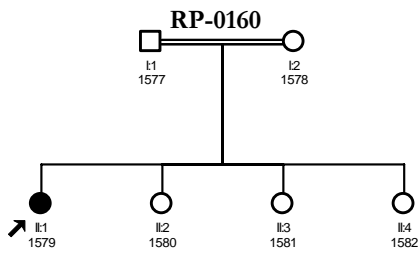


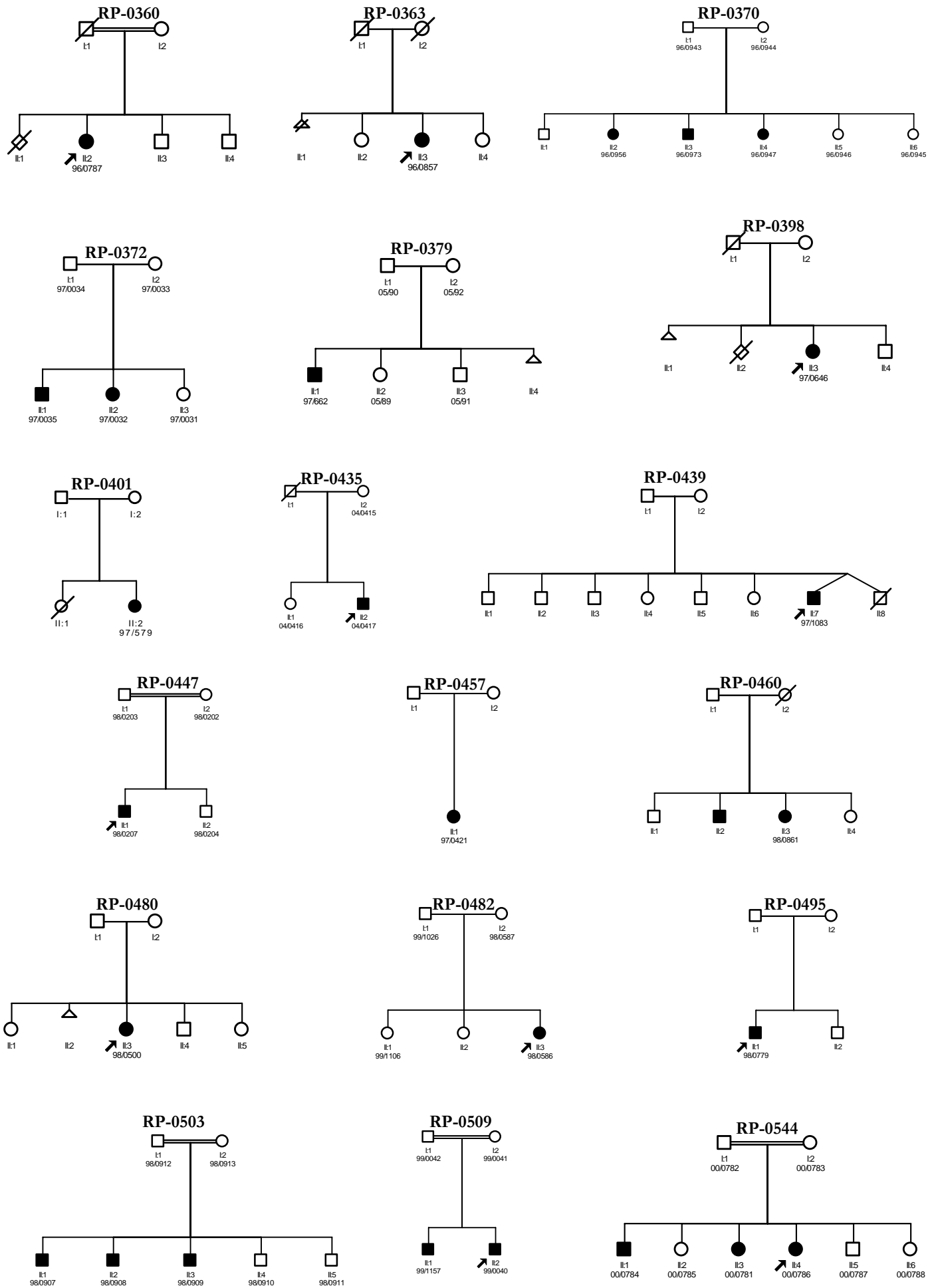


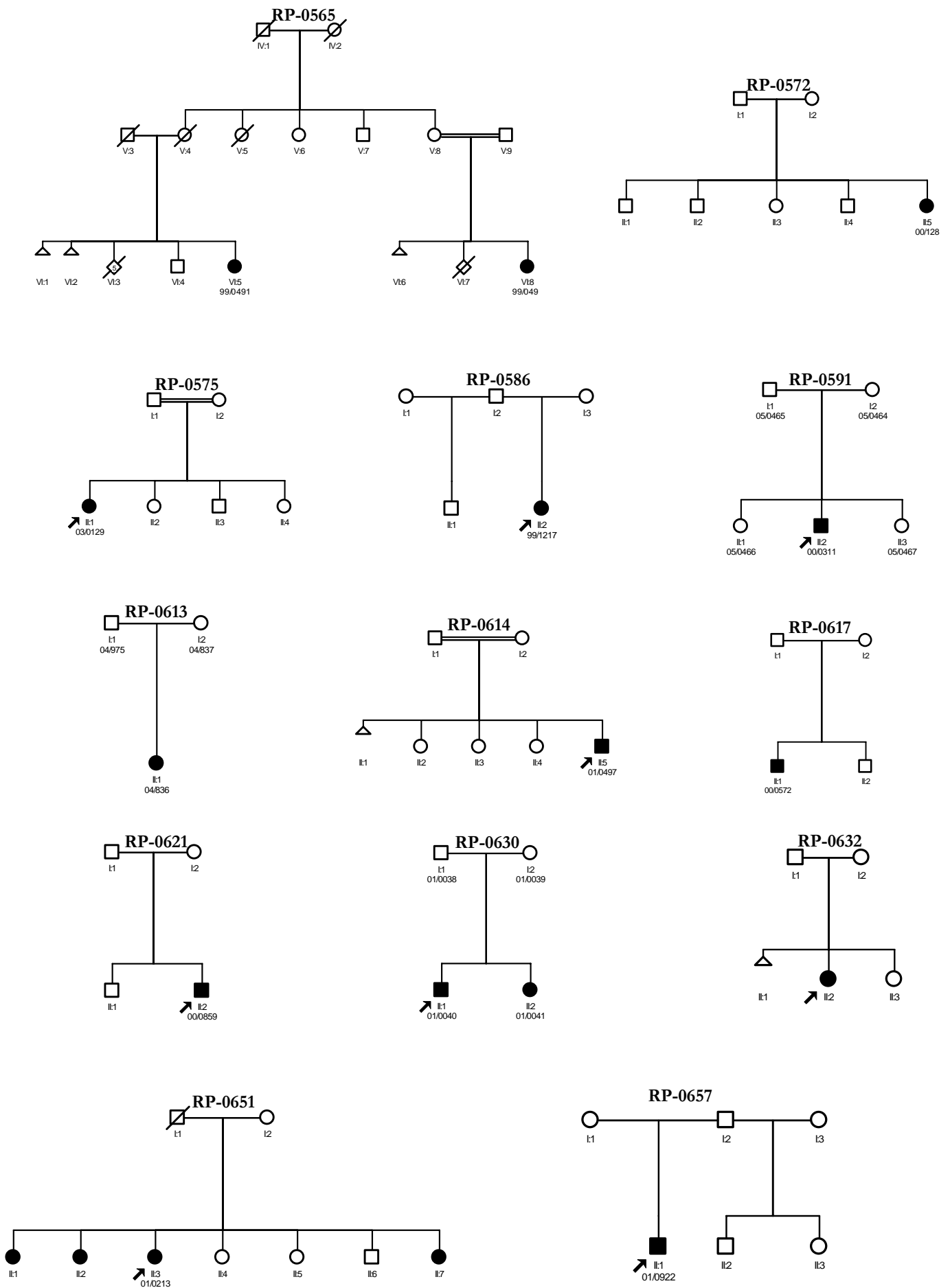


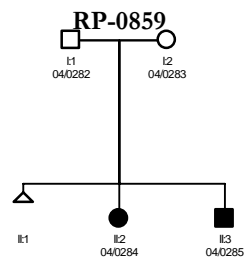
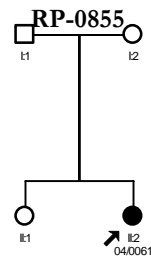
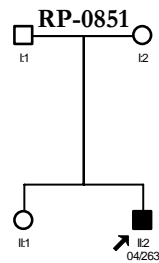
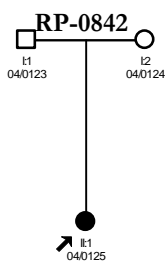
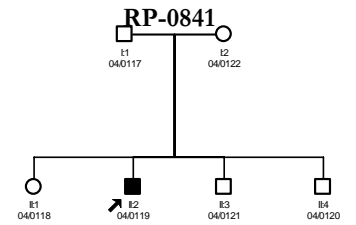
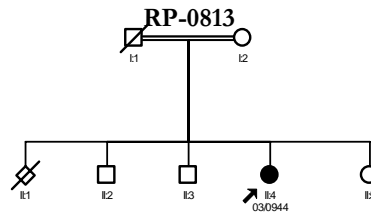
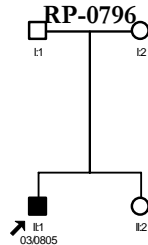
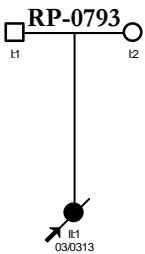
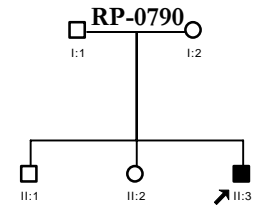
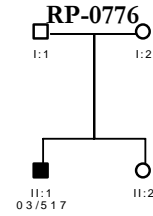
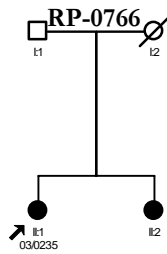
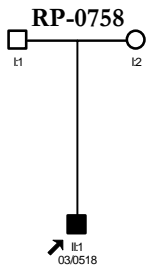
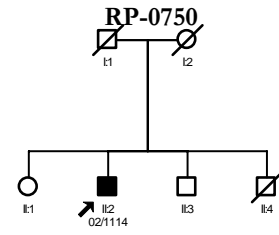
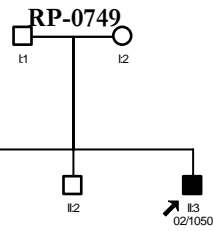
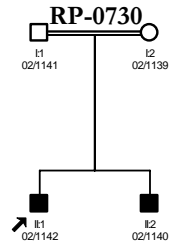
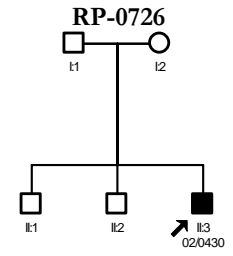
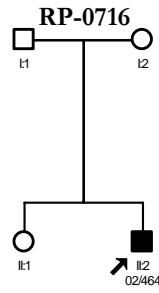
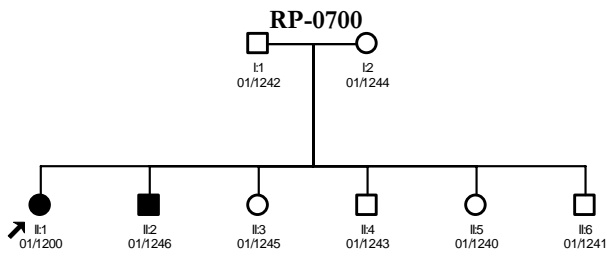
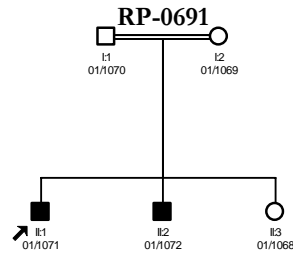
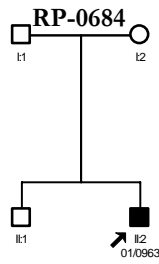
3.1.2.2. 128 familias RP-IP

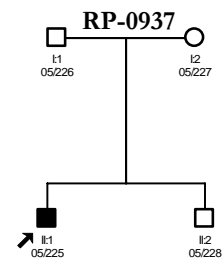
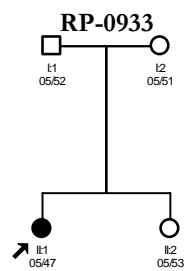
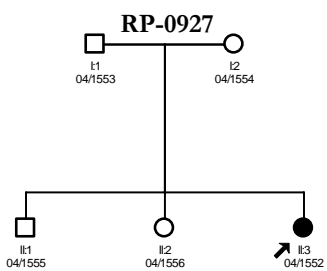
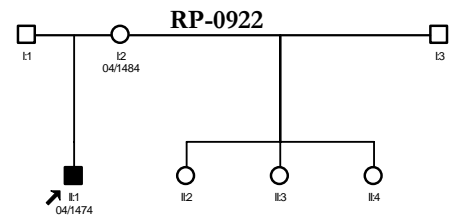
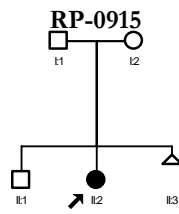
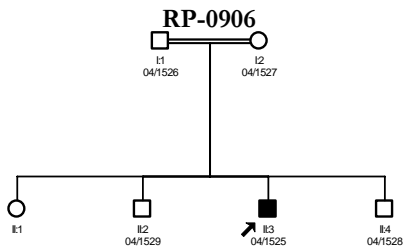
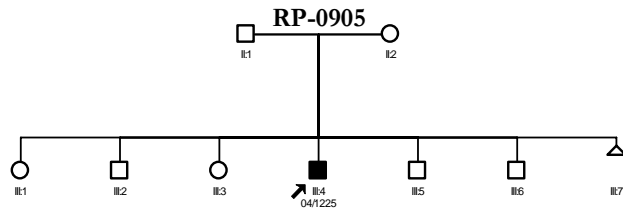
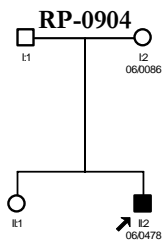
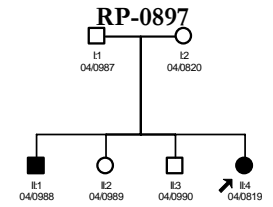
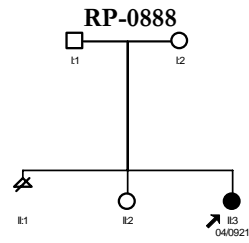
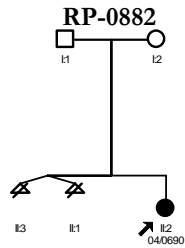
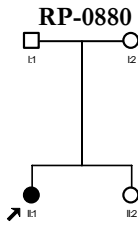
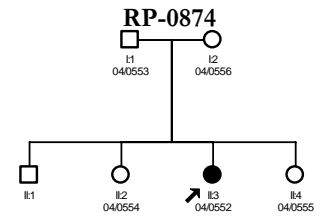
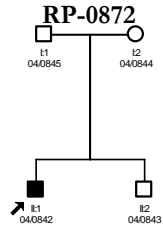
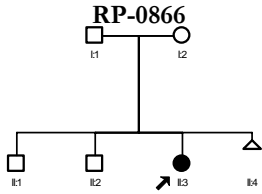
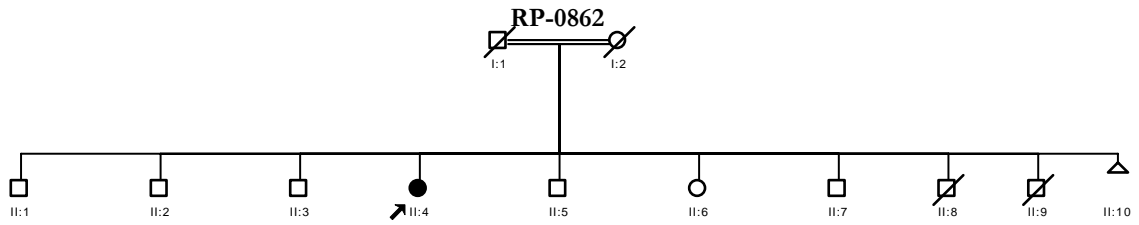


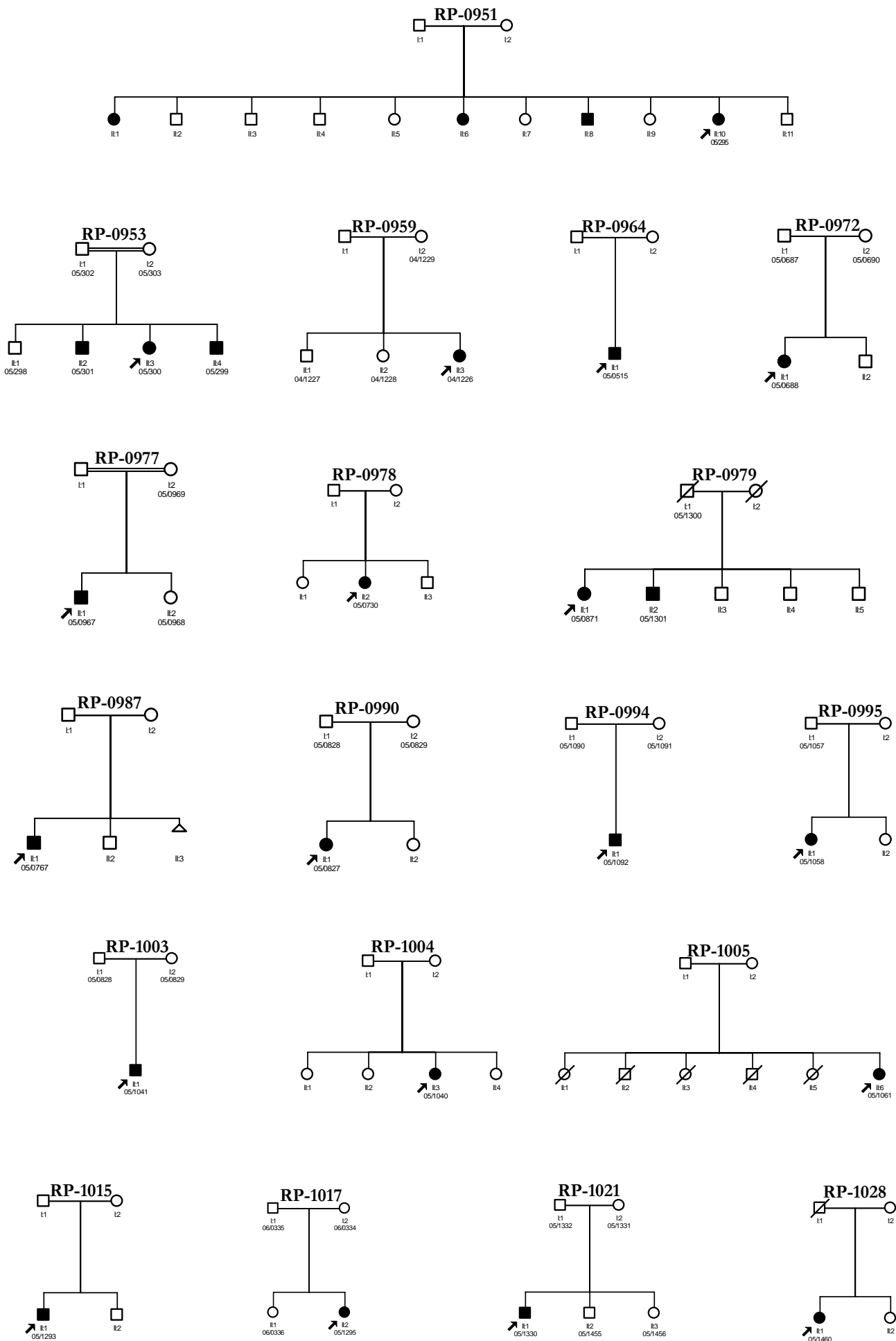


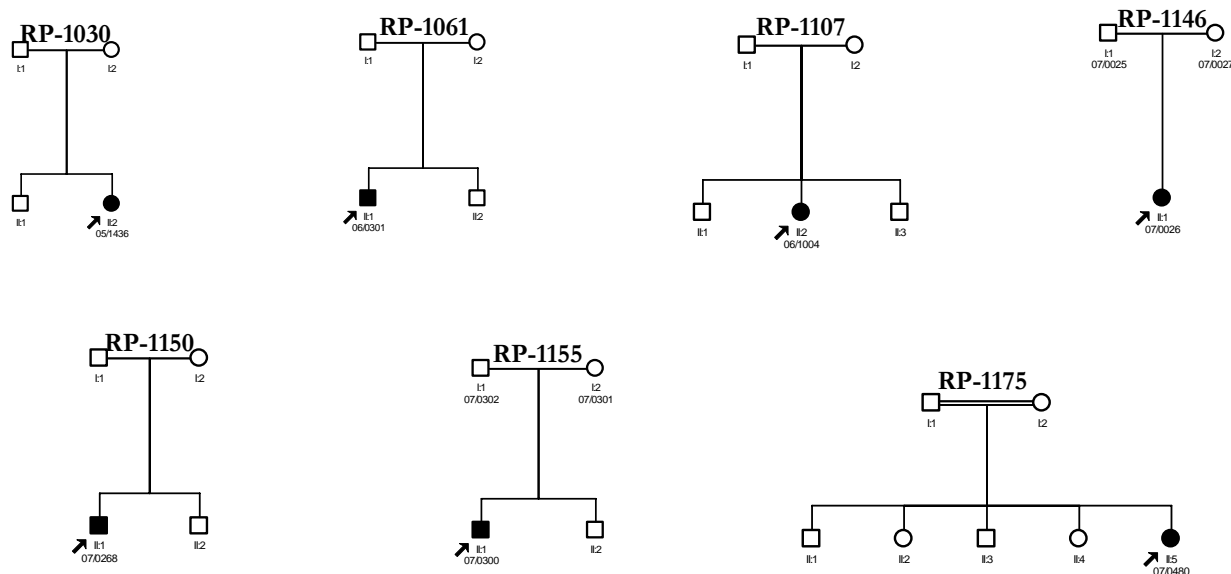












3.1.3. Individuos control

Se ha empleado una batería de ADNs obtenidos a partir de sangre periférica de población española para estimar la frecuencia de mutaciones y polimorfismos encontrados en nuestros resultados.

Todos los controles utilizados en este trabajo son individuos donantes del Banco de Sangre de la Fundación Jiménez Díaz que han leído y firmado un consentimiento informado específico para muestras control que se puede consultar en el Anexo II. Este consentimiento permite el uso de su muestra de sangre de forma anónima por el Departamento de Genética de la Fundación Jiménez Díaz y en ningún momento los pacientes obtendrán un resultado de este estudio.

3.2. Métodos

3.2.1. Protocolo de actuación

El estudio de las 177 familias (49 LCA y 128 RP-IP), se ha dividido en dos fases fundamentales, un cribado inicial de mutaciones mediante una herramienta de genotipado de ADN específico de LCA (microarray LCA) y posteriormente un estudio orientado en cada familias según los resultados obtenidos.

3.2.2. Técnicas moleculares empleadas

3.2.2.1. Extracción de ADN (Vínculo 3.1)

El ADN de los pacientes y los controles se extrajo de muestras de sangre periférica y células de la mucosa bucal mediante un extractor automático (*BioRobot EZ1*, *QIAGEN*, Hilden, Germany).

BioRobot EZ1

<http://www1.qiagen.com/Products/Automation/BioRobotEZ1DSP.aspx>

Vínculo 3.1. Extractor automático de ADN

3.2.2.2. Método Directo

3.2.2.2.1. Microarray LCA (Vínculo 3.2)

Todas las familias presentadas en este trabajo fueron estudiadas inicialmente mediante un microarray de genotipado específico para LCA.

Esta herramienta diseñada por la empresa Asperbiotech, con sede en Tartu, Estonia y se emplea para identificar 423 mutaciones ya descritas en 10 genes responsables de LCA y RP-IP (Tabla 3.2).

Este microarray está basado en la técnica APEX (*Arrayed Primer Extension*) que se emplea para la detección de mutaciones conocidas y su fundamento es el mismo que el de la secuenciación automática: el empleo de nucleótidos dideoxi (ddNTP). Para

ello existen portaobjetos comerciales donde se encuentran inmovilizados de forma comercial una serie de oligos por el extremo 5' y cuya secuencia es específica de una mutación concreta.

El ADN del paciente se amplifica mediante PCR y se añade al porta para su hibridación. El fragmento hibridará con el oligo inmovilizado dejando sin aparear la base siguiente al extremo 3' de la muestra del paciente, que es el nucleótido que se quiere detectar (Fig. 3.1).

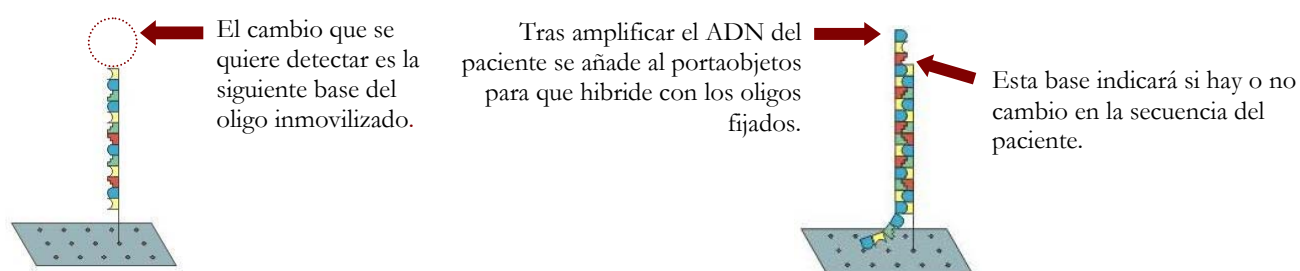


Figura 3.1. Esquema del diseño e hibridación del microarray LCA.

Para la detección del nucleótido desapareado en el extremo 3' se añaden nucleótidos dideoxi marcados con fluorocromos, lo cuales se unirán de forma complementaria a la base desapareada e impidiendo la unión de otros nucleótidos ya que los dideoxis impiden la elongación gracias a la modificación del grupo OH por un H, es decir, la técnica de terminación de cadena de Sanger. La detección de este dideoxi permitirá conocer la base en esa posición en el paciente (Fig. 3.2).

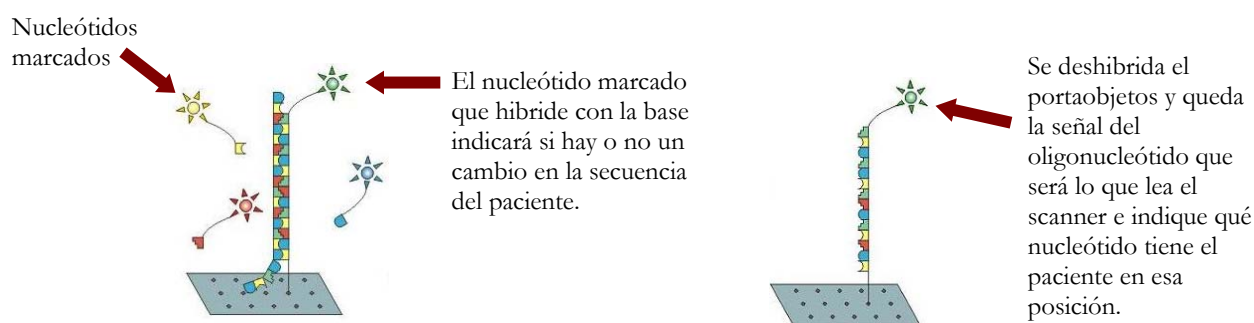


Figura 3.2. Esquema del funcionamiento del microarray LCA.

Los genes estudiados por el microarray de LCA están reflejados en la tabla 3.2. Actualmente el microarray estudia 338 mutaciones y 6 polimorfismos descritos en los 10 genes.

Gen	OMIM	Locus	
<i>AiPL1</i>	604392	17p13.1	<i>Arylhydrocarbon-Interacting Receptor Protein-Like 1</i>
<i>CEP290</i>	610142	12q21.3	<i>Centrosomal Protein, 290-KD</i>
<i>CRB1</i>	604210	1q31-q32.2	<i>Crums, Drosophila, Homolog of, 1</i>
<i>CRX</i>	602225	19q13.3	<i>Cone-Rod Homeo Box-Containing Gene</i>
<i>GUCY2D</i>	600179	17p13.1	<i>Guanylate Cyclase 2D, Membrane</i>
<i>LRAT</i>	604863	4q31	<i>Lecithin Retinol Acyltransferase</i>
<i>MERK1</i>	604705	2q14.1	<i>Mer Tyrosine Kinase Protooncogene</i>
<i>RDH12</i>	608830	14q23.3	<i>Retinol Dehydrogenase 12</i>
<i>RPE65</i>	180069	1p31	<i>Retinal Pigment Epithelium-Specific Protein, 65-kD</i>
<i>RPGRIP1</i>	605446	14q11	<i>Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator-Interacting Protein</i>

Tabla 3.2. Relación de los genes estudiados por el microarray LCA

Microarray LCA

<http://www.asperophthalmics.com/LeberCongenitalAmaurosisDNAtest.htm>

Vínculo 3.2. Microarray LCA

3.2.2.2.2. PCR convencional: cebadores y condiciones

La Reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), es una técnica de biología molecular descrita en 1985 por Kary Mullis. Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN.

Para realizar la técnica se necesitan: el ADN molde que se quiere estudiar, desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), dos cebadores (oligonucleótidos) complementarios a una de las dos hebras del ADN, un tampón que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa, iones de magnesio (Mg^{2+}),

agregado comúnmente como cloruro de magnesio ($MgCl_2$), como cofactor de la polimerasa y ADN polimerasa (*Taq* polimerasa).

Con el fin de simplificar y hacer más ágil el estudio de las muestras, se unificaron los protocolos de amplificación de los productos de PCR (Tablas 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9 y 3.10).

Agua	PCR Buffer 10x	dNTPs	Cebadores	DNA	Enzima	
15,3 μ l	2,5 μ l	3 μ l	3 μ l	1 μ l	0,2 μ l	95° → 5'
	(+MgCl ₂)	[1,25mM]	[5pmol/ μ l]	[100ng/ μ l]		95° → 30"
						An* → 20"
						74° → 50" ← 35 ciclos
<i>Braun</i>	<i>Roche</i>	<i>Invitrogen</i>	<i>Pacisa-Giralt</i>		<i>Roche</i>	74° → 5'
						4° → ∞

Tabla 3.3. Condiciones de la PCR

Volumen final 25 μ l

* An= "Anillamiento" depende de cada fragmento

Gen *AIPL1*

Exón	Secuencia <i>Forward</i> (5'-3')*	Secuencia <i>Reverse</i> (5'-3')*	Anillamiento
1	GACACCTCCCTTTCTCCT	AATGTTGAAAGCTGCTGTGG	60°
2	GGGCCTTGAACAGTGTGTC	TTTCCCGAAACACAGCAGC	60°
3	AGTGAGGGAGCAGGATTCC	TGCCCCATGATGCCCCGCTGTC	60°
4	TTTCGGGTCTCTGATGGG	GCAGGCCCCCCCAGTGTC	55°
5	GCAGCTGCCTGAGGTCAT	GGTGGGGTGGAAAAGAAAAG	60°
6	GTAGCTGGATGCTCCCTG	CCACTTGCTCCCTGCCTG	60°

Tabla 3.4. Cebadores del gen *AIPL1* [Hanein *et al.*, 2004]

Gen *CEP290* mutación *p.Cys998ter*

Intrón	Secuencia <i>Forward</i> (5'-3')*	Secuencia <i>Reverse</i> (5'-3')*	Anillamiento
26	CGATCTCCTGAACTCGTGATCCA	GAGTCACATGGGAGTCACAGGGT	60°

Tabla 3.5. Cebadores del gen *CEP290* [Vallespín *et al.*, 2007a]

Gen *CRB1*

Exón	Secuencia <i>Forward</i> (5'-3')*	Secuencia <i>Reverse</i> (5'-3')*	Anillamiento
1	CAGCAACACACCAGAGGATG	ATAATACGCCAGAACTAAACCAG	55°
2A	GGTTGAGGCAGCACAAAGGTC	CAGGAGTTCTTGCCAACGG	60°
2B	GTACAGTGGGACAATCTGTG	CCAAGTCGCAGTGTCTGCC	60°
2C	GATGGAATTGATGGTTACTCC	TCACCTCTGCCTCTGCCAC	60°
3A	GCTCTGGTAAACAAAGCATTG	GAATCCAGGGGACAGTCG	60°
3B	GACGAATGTTGGTCCCAGC	CAGAGTGGTAAAAATAGTTTCATG	60°
4	GAAACAGTATAAAGATATCTGATC	GCTATAAGCGATATGTGTATTTC	55°
5	CAACGTGATAGATCGATGCC	CACAGCTCTTCCTGCTAATAC	55°
6A	ACAAGTAAATTACGTGAACTTC	AGTGAGGGATGCATGTTCC	60°
6B	ATTCTCCTGGGCTGTACC	GCTATGTTACAACTGAGCC	60°
6C	GCGATGGCTTCCTGTGGG	TGCCACTCTCCATCGCTGG	60°
6B	CAGGTCAATAATCAGTCAAAGG	CAAACGAAGGTGTGGATGGC	60°
6D	ACCAGTGGGAATGACCAGC	CTGTGGCAGTCACACTGG	60°
6E	CAACCTTGTCAAAGCAGAGG	CTCTGAGGCATGGCACTCC	60°
7A	TTCTCCTCCTCCTCTATTTTG	ACACGGATATATTGATAAGTGC	60°
7B	CTCCATGTTTGTCCGAACGC	TCTTGCTTGTGAGGTAGGC	60°
7C	TCAGTCTTCACAAAACCTAGG	ATAAAGTAAAAGTTTAGCATACAG	60°
8	CAACATTTTCTATTTAGTTGCC	CTCAAATGTCGCAACTTAACTG	60°
9A	AATGATCATTACTATTAATAACGG	GTGCCATCATTCACTGACTG	55°
9B	GTGGCAACAGCTTTTATATGC	CATGAACATTTTCAAAGTAAGAG	60°
9C	ATATAAAGGGCCTGCAAGGG	GCTGCAACTCTGTCAGAGC	60°
9D	GAACTCAACATCGATGAATGC	CAGTGATGCAGAGTATAGCTTC	60°
10	CTTGAATGAGATGAACAAGATG	GAGGAGAAGATGAACTTTGAG	60°
11A	ACCAATGTATTCAACAGGGACC	TTACGTCCACCTCGCAGC	60°
11B	TCTGTGCCAGGACTTACTC	CAGAGATCTAAAATGAATCAAG	60°
12	GCCTTTGCTATAGAATTTCGC	AGTACAGTCATCACATTCACA	60°

Tabla 3.6. Cebadores del gen *CRB1* [Hanein *et al.*, 2004]**Gen *CRX***

Exón	Secuencia <i>Forward</i> (5'-3')*	Secuencia <i>Reverse</i> (5'-3')*	Anillamiento
1	GTCACCCCATGGTGAGTAAC	GTCCTCCAAGAGATGAGGCC	60°
2	GGAATTCTTGGTCATCCAC	CTTTGTTCCGGGCAGGCCTC	60°
3A	CACCTCTACCAATAAGTGTC	CTGCGCCTCAGGCAAAGGGG	60°
3B	CCCTCAGGCTCCCCAACAC	GACTGGGCCAGGGAAGGTC	60°
3C	CTAGGGGGCCCGGCTCTTAG	ATCTAAACTGCAGGGAAGCAGATTC	60°

Tabla 3.7. Cebadores del gen *CRX* [Hanein *et al.*, 2004]

Gen *GUCY2D*

Exón	Secuencia <i>Forward</i> (5'-3')*	Secuencia <i>Reverse</i> (5'-3')*	Anillamiento
10	AGCAGGCTGAGGCTGCCTCT	CCCAGTCCATCCTCGTCTGC	60°

Tabla 3.8. Cebadores del gen *GUCY2D* [Hanein *et al.*, 2004]**Gen *RDH12***

Exón	Secuencia <i>Forward</i> (5'-3')*	Secuencia <i>Reverse</i> (5'-3')*	Anillamiento
1	CAGGAACCTGAGCCAGAGC	TTTCTCCTCTGTCAGCCTCC	60°
2	CGTATCTTAGTGTGAGCTCG	GAATTCTTAGTCAGAGCCCC	60°
3	CCAGTCCCAAGCTCACTTAC	AGGGTGGAGCAGCCACTC	60°
4	ATTATGCAGGTCTGTTACAG	CTCCACATTTACACAGTGTC	60°
5	TCCTCTTGCTCCCACATGC	CCCAAGTTGCTGTGGACCTC	60°
6	TGTGTATTTTGCTGCAGGAG	GATGAACAGCCCAGCGAG	60°
7	GGGACCATAAAGATTTCCAG	GATCAGAGCAGGCAGGATTC	60°

Tabla 3.9. Cebadores del gen *RDH12* [Hanein *et al.*, 2004]**Gen *RPGRIP1***

Exón	Secuencia <i>Forward</i> (5'-3')*	Secuencia <i>Reverse</i> (5'-3')*	Anillamiento
14	GAAAGAGCTCCCTACCCTT	GGAAATTCTGCATTGGTGC	60°
21	CTTGGAGCCTCACTAACC	TTCATCAGACTTCCTCACC	60°

Tabla 3.10. Cebadores del gen *RPGRIP1* [Hanein *et al.*, 2004]

3.2.2.2.3. Análisis de restricción

En base a la actividad de las enzimas de restricción se diseñan los estudios de un cambio concreto en la secuencia de ADN. Este cambio puede dar lugar al corte de la enzima o por el contrario puede destruir un lugar de corte.

La forma clásica de ver los resultados obtenidos tras la digestión la enzima es mediante la electroforesis en gel de acrilamida o agarosa (3.2.2.2.3.1. Gel de agarosa), mientras que para el estudio de algunas mutaciones de este trabajo se diseñó otro tipo de análisis de restricción basado en el uso del secuenciador automático *ABI Prism 3100 genetic analyzer* y por tanto el empleo de cebadores marcados con fluorocromos (3.2.2.2.3.2. Análisis de restricción en *ABI Prism 3100*). Las condiciones de restricción se muestran en la tabla 3.11.

Producto de PCR	Tampón	Enzima de restricción	Agua
10 µl	2 µl	3 µl	5 µl
		[10 u/µl]	
		<i>New England Biolabs</i>	<i>Braun</i>

Tabla 3.11. Condiciones del análisis de restricción

3.2.2.2.3.1. Gel de agarosa

Una vez digerido con la enzima de restricción indicada el producto de PCR, se carga este producto en un gel de agarosa al 3% (Tabla 3.12) y se somete a un campo eléctrico de 90 V durante media hora aproximadamente (según tamaño de los fragmentos). El patrón de bandas obtenido permitirá conocer qué cambio se produce en la hebra de ADN de la muestra. Las enzimas empleadas para el estudio de los diferentes cambios en el ADN se representan en la tabla 3.13.

Tampón TBE 1x	Agarosa	Bromuro de Etidio
50 ml	1,5 mg	3 µl
<i>Pronadisa</i>	<i>Serva</i>	<i>Roche</i>

Tabla 3.12. Gel de agarosa al 3%

	Diana		T ^a óptima	Tiempo	Cambio a estudiar
<i>AluI</i>	5' AG'CT	3'	37°C	3h	<i>RPGRIP1</i> 14 1767G>T p.Gln589His
	3' TC'GA	5'			
<i>BfaI</i>	5' C'TAG	3'	37°C	3h	<i>CRB1</i> 11 3988G>T p.Glu1330ter
	3' GAT'C	5'			
<i>HinA</i>	5' G'ANTC	3'	37°C	3h	<i>RPGRIP1</i> 21 3341A>G p.Asp1114Gly
	3' CTNA'G	5'			
<i>Hpy188III</i>	5' TC'NNGA	3'	37°C	3h	<i>GUCY2D</i> 10 2101C>T p.Pro701Ser
	3' AGNN'CT	5'			
<i>SspI</i>	5' AAT'ATT	3'	37°C	3h	<i>CRB1</i> 9 3002A>T p.Ile1001Asn
	3' TTATAA	5'			
<i>Tsp45I</i>	5' GTSAC	3'	65°C	3h	<i>CRB1</i> 6 c.1690G>T p.Asp564Thr
	3' CASTG'	5'			

Tabla 3.13. Enzimas de restricción y mutaciones asociadas para estudio en electroforesis en gel

3.2.2.2.3.2. Análisis de restricción en *ABI Prism 3100* (Vínculo 3.3)

Se ha diseñado un análisis de restricción diferente del convencional, que disminuye el tiempo de trabajo y aumenta la capacidad de detección de productos obtenidos, ya que el *ABI Prism 3100 genetic analyzer* permite detectar fragmento de menor tamaño o con menor separación que en agarosa. El diseño del análisis varía respecto del convencional, ya que en agarosa se verán en forma de banda todos los fragmentos obtenidos tras la restricción según el patrón de corte de la enzima, mientras que para realizar este análisis se ha de tener marcado el cebador que queda en el fragmento que corta la enzima según haya o no mutación, asegurándose de que no hay ningún otro punto de corte entre medias.

Al ser una técnica desarrollada en el laboratorio, se explica con el ejemplo de una mutación concreta en el gen *AIPL1* (p.Tyr134Phe). Para poder llevar a cabo el análisis en el *ABI Prism 3100 genetic analyzer* es necesario que la muestra presente un marcaje con fluorocromos, para ello se marca uno de los cebadores con un fluorocromo, en este caso, el fluorocromo es PET (rojo).

Tras realizar una PCR convencional del exón 3 del gen *AIPL1*, se somete a digestión con la enzima *TaqI*. Cuando no hay mutación la enzima de restricción cortará en la secuencia señalada en amarillo dando un fragmento de 286 pb marcado con el fluorocromo, mientras que el otro fragmento obtenido tras el corte (81 pb), no se verá en el secuenciador puesto que no va marcado. Cuando el individuo presente la mutación, se habrá creado una nueva diana de restricción y el fragmento marcado se acortará, dando un fragmento de 236 pb (Fig. 3.3).

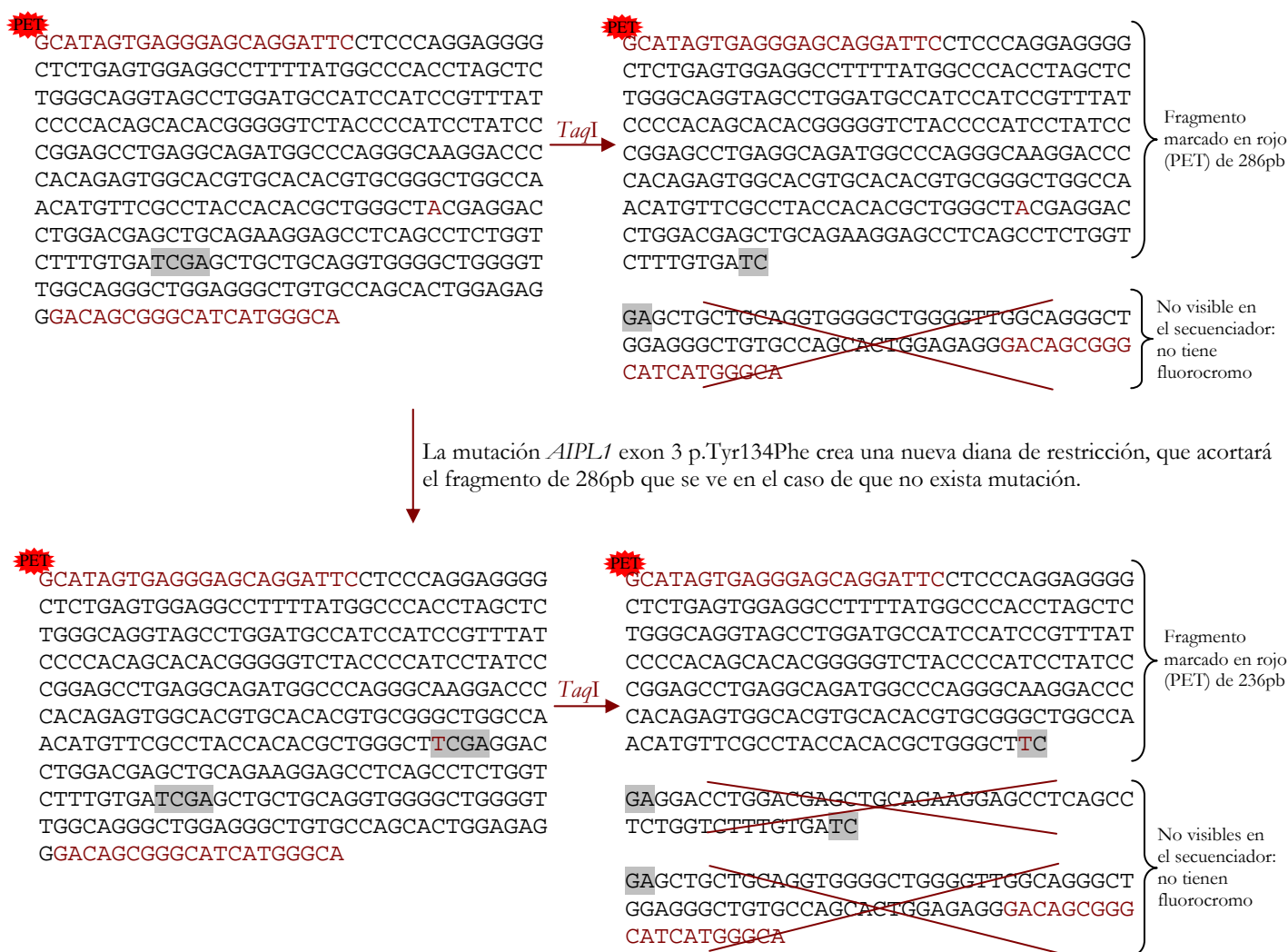


Figura 3.3. Esquema del análisis de restricción en el *ABI Prism 3100 genetic analyzer* de la mutación p.Tyr134Phe.

Una vez analizadas las muestras en el *ABI Prism 3100 genetic analyzer* se obtendrá un patrón de bandas o picos de diferentes tamaños, que indican si hay mutación o no, y en el caso de que haya mutación se verá si es en homocigosis o en heterocigosis (Fig. 3.4). En este ejemplo no se muestra ningún homocigoto, ya que no se ha encontrado ninguno ni entre pacientes ni en población control.

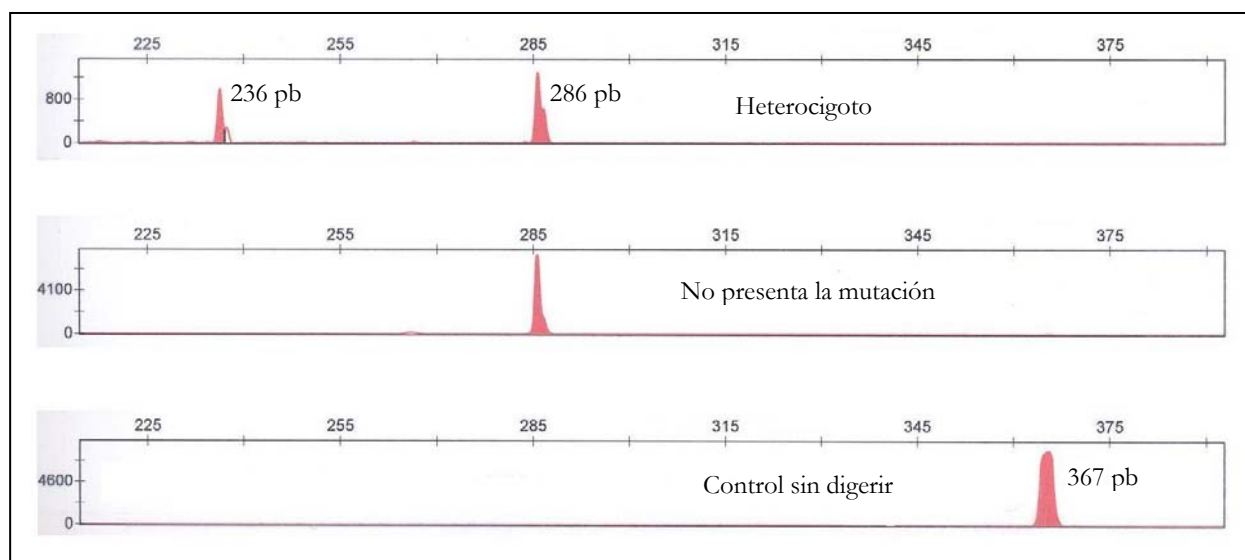


Figura 3.4. Patrón obtenido en el *ABI Prism 3100 genetic analyzer*: heterocigoto (arriba), sin mutación (medio) y control sin digerir (abajo).

Los cebadores y las enzimas empleadas para el estudio de los diferentes cambios en *AIPL1* se detallan en las tablas 3.14 y 3.15 respectivamente.

AIPL1

Exón	Secuencia <i>Forward</i> (5'-3')*	Secuencia <i>Reverse</i> (5'-3')*
2	PET-GGGCCTTGAACAGTGTGTC	TTTCCCGAAACACAGCAGC
3	PET-AGTGAGGGAGCAGGATTCC	TGCCCATGATGCCCGCTGTC

Tabla 3.14. Condiciones de la PCR, exones 2 y 3 del gen *AIPL1* [Hanein *et al.*, 2004]
Volumen final 25µl

95° → 5'
95° → 30"
60° → 20"
74° → 50" ← 35 ciclos
74° → 5'
4° → ∞

		Diana	Tª óptima	Tiempo	Cambio a estudiar
<i>AclI</i>	5'	C'CGC	37°C	3h	<i>AIPL1</i> 2 c.111delC p.Arg38fs
	3'	GGC'G			
<i>TaqI</i>	5'	T'CGA	65°C	3h	<i>AIPL1</i> 3 c.401A>T p.Try134Phe
	3'	AGC'T			

Tabla 3.15. Enzimas de restricción y mutaciones asociadas para estudio con el *ABI Prism 3100 genetic analyzer*.

3100 Genetic Analyzer
<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=600530&tab=DetailInfo>

Vínculo 3.3. Secuenciador automático

3.2.2.2.4. dHPLC (Vínculo 3.4)

El cribado de los fragmentos de ADN se ha llevado a cabo mediante el sistema de análisis dHPLC (*denaturing High-Performance Liquid Chromatography, WAVE, Transgenomic, Omaha, NE*). Esta técnica se basa en análisis de fragmentos mediante una columna de cromatografía desnaturizante. El análisis de los homoduplex/heteroduplex que se forman tras la desnaturalización y renaturalización de la muestra amplificada por PCR indica la presencia o ausencia de cambios en la secuencia.

El dHPLC sólo puede discriminar las muestras que presenten un cambio en heterocigosis, ya que las muestras con cambios en homocigosis pasarán por la columna cromatográfica igual que lo hacen las que no presentan ningún cambio, puesto que no se ha producido la formación de los heteroduplex (Fig. 3.5). Para evitar esta limitación de la técnica todas las muestras se mezclan con un control negativo, es decir, una muestra donde se sabe que no hay ningún cambio en la secuencia. Ello permitirá ver cambios en homocigosis.

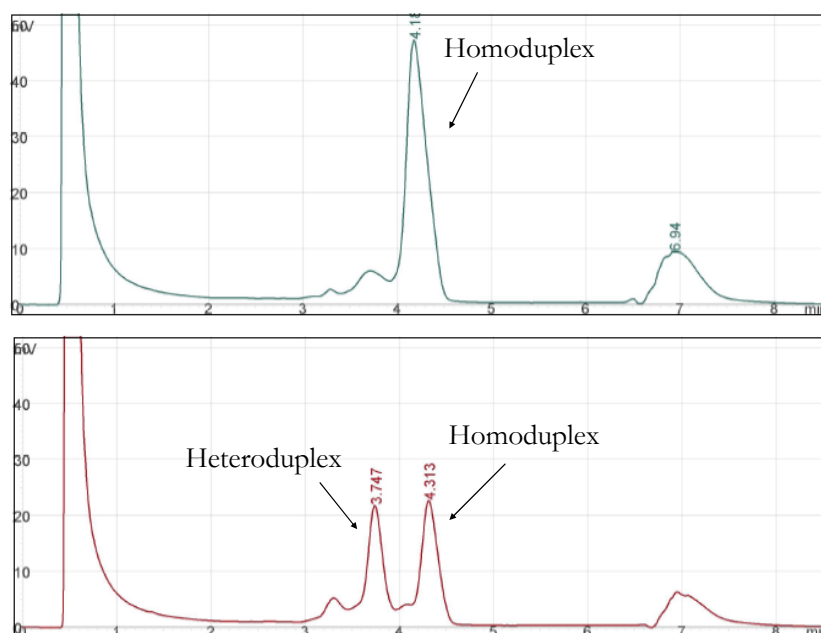


Figura 3.5. Patrón normal (arriba) y patrón alterado (abajo) del exón 2A de *CRB1*.

Una vez mezclado el producto de PCR, se somete a una desnaturalización durante 5 minutos y una posterior renaturalización hasta temperatura ambiente que ha de durar como mínimo 45 minutos. Posteriormente se carga un volumen de 5 μ l en el dHPLC que pasará por la columna *DnaSep column; Transgenomic* y analizará la

formación de hetero y homodímeros mediante un gradiente de acetonitrilo. El flujo es de 0.9 ml/min y el ADN es detectado a 260nm. Para cada región se ha realizado un análisis con diferentes temperaturas diseñadas a partir de la temperatura de fusión (T_m “*Melting*”).

Esta técnica se ha empleado para el cribado de los genes *AIPL1*, *CRB1* y *CRX*. La temperatura de fusión (T_m) de cada uno de los fragmentos se representa en las tablas 3.16, 3.17 y 3.18.

<i>CRB1</i>				
Exón	T ^a -1	T ^a -2	T ^a -3	T ^a -4
1	58,7 °C	----	----	----
2A	54 °C	56,6 °C	59,7 °C	----
2B	59,9 °C	61,1 °C	----	----
2C	58,3 °C	55,1 °C	56,1 °C	----
3A	55,5 °C	57 °C	58,5 °C	61 °C
3B	59,5 °C	61,7 °C	----	----
4	54,6 °C	59,4 °C	----	----
5	56,7 °C	59,6 °C	----	----
6A	51,8 °C	----	----	----
6B	59,4 °C	61,7 °C	62 °C	----
6C	57,5 °C	58,5 °C	60,5 °C	----
6D	57,5 °C	59,7 °C	61 °C	----
6E	58,7 °C	59 °C	61 °C	----
6F	58,9 °C	62,7 °C	64 °C	----
7A	53,7 °C	57 °C	60,5 °C	61 °C
7B	57,1 °C	58,6 °C	61,3 °C	63,1 °C
7C	55 °C	56 °C	57,9 °C	58,6 °C
8	58,6 °C	59,9 °C	62,8 °C	65,4 °C
9A	55,5 °C	56 °C	56,6 °C	----
9B	58,3 °C	60,3 °C	62,3 °C	----
9C	57,4 °C	60 °C	----	----
9D	57,7 °C	61,1 °C	61,7 °C	----
10	57,1 °C	60 °C	----	----
11A	59,5 °C	62 °C	65,4 °C	----
11B	55,1 °C	59,1 °C	63 °C	----
12	58,4 °C	61 °C	64 °C	----

Tabla 3.16. T_m para CRB1

<i>AIPL1</i>			
Exón	T ^a -1	T ^a -2	T ^a -3
1	64 °C	66,3 °C	----
2	61,4 °C	63,1 °C	64,6 °C
3	62,5 °C	63,7 °C	65,1 °C
4	63,4 °C	63,8 °C	64,4 °C
5	61,8 °C	62,7 °C	68,5 °C
6	65,3 °C	66,3 °C	----

Tabla 3.17. T_m para *AIPL1*

<i>CRX</i>			
Exón	T ^a -1	T ^a -2	T ^a -3
1	61,2 °C	63,2 °C	----
2	63,6 °C	67 °C	----
3A	63,4 °C	64,1 °C	65,2 °C
3B	64,1 °C	66,5 °C	----
3C	61,3 °C	64,4 °C	----

Tabla 3.18. T_m para CRX

3.2.2.2.5. Secuenciación automática (Vínculo 3.5)

Este método de secuenciación de ADN fue diseñado por Sanger, Nicklen y Coulson en 1977 y se conoce como método de los terminadores de cadena o dideoxi. En este caso se marcan los dideoxis con un compuesto fluorescente. Los productos de la reacción se detectan directamente durante la electroforesis ya que al pasar por delante del láser se excitan los fluorocromos permitiendo detectar la fluorescencia emitida.

Para llevar a cabo esta técnica es necesario hacer una PCR clásica con los cebadores específicos de cada fragmento de ADN que se quiere amplificar, en este trabajo se emplearon los mismos cebadores que para el dHPLC (Tablas 3.4, 3.5, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9 y 3.10).

El producto de PCR se procesa por el sistema *EZNA* (método de purificación mediante columnas, *Omega Biotek*, EE.UU. Vínculo 3.5) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Usando como molde el producto de PCR amplificado se lleva a cabo la reacción de secuenciación (Tabla 3.19), donde se añadirá una combinación de los dideoxis marcados con fluorocromos (ddNTPs) así como de los dNTPs de la reacción de PCR clásica. En el laboratorio se usa un producto comercial de *Applied Biosystems* llamado *dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Kit* (*ABI Prism*, *Applied Biosystems*, *Foster City*, CA, USA). Ver Vínculo 3.5.

Tras la reacción de secuenciación el producto se purifica mediante columnas *Centri-Sep™* (*Centri-Sep™ Columns*, *Applied Biosystems*, Vínculo 3.5) según las instrucciones del fabricante.

Una vez se obtiene el producto purificado se analiza en el secuenciador automático *ABI Prism 3100 genetic analyzer* (Vínculo 3.5). Esta técnica permite leer la secuencia de una región concreta del genoma y de este modo ver cuál es el cambio exacto a nivel de nucleótido.

Agua	Premix	Primer	DNA	
9 µl	4 µl	1 µl	6 µl	94° → 3'
	dRhodamine		[100ng/µl]	96° → 10"
				50° → 5" 25 ciclos
Braun	Applied Biosystems	Pacisa-Giralt		60° → 4' ←
				4° → ∞

Tabla 3.19. Condiciones de la PCR de secuenciación
Volumen final 20µl

EZNA purification kit
<http://www.omegabiotek.com/productsrange/danrancleanup/products-dnarnacleanupmain.html>

dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Kit
<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=601926&tab=Laiterature>

Centri-Sep™ Columns
<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=601920&tab=DetailInfo>

3100 Genetic Analyzer
<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=600530&tab=DetailInfo>

Vínculo 3.5. Protocolo de secuenciación automática

3.2.2.3. Análisis indirecto: estudio familiar (Vínculo 3.6)

El análisis de microsatélites para la construcción de haplotipos, se basa en la amplificación de regiones polimórficas adyacentes o intragénicas del gen candidato de estudio para establecer su herencia concreta en la familia. Este método indirecto permite establecer si un gen puede ser o no responsable de la patología.

Para llevar a cabo esta metodología se han seleccionado una serie de microsatélites que están muy próximos al gen y que, por tanto, sirven de marcadores para seguir la herencia del mismo en cada individuo. El estudio se ha llevado a cabo en el secuenciador automático *ABI Prism 3100 genetic analyzer*.

Se realiza una PCR *multiplex* (con más de una pareja de cebadores) siguiendo las condiciones y los ciclos indicados en la tabla 3.20. Los microsatélites diseñados para este estudio se pueden ver en las tablas 3.21, 3.22, 3.23, 3.24 y 3.25.

Agua	Buffer 10x	dNTPs	Cebadores	DNA	Enzima	94° → 12'
X*	1,5 µl	4 µl	P1+P2+P3+P4	1 µl	0,2 µl	94° → 15"
	(+MgCl ₂)	[1,25mM]	[5pmol/µl]	[100ng/µl]		55° → 15" ← 10 ciclos
						72° → 30"
<i>Braun</i>	<i>Roche</i>	<i>Invitrogen</i>	<i>Applied Biosystem</i>		<i>Roche</i>	89° → 15"
						55° → 15" ← 20 ciclos
						72° → 30"
						72° → 30'
						4° → ∞

Tabla 3.20. Condiciones de la PCR de microsatélites

*X=15-(6,7+P1+P2+P3+P4) µl

Volumen final 15µl

AIPL1

Macador	Fluorocromo	Tamaño	F+R [5pmol/µl]	Distancia cM
D17S938	6FAM	164-182	P1=1,5 µl	0,078 cM (anterior)
D17S796	PET	144-174	P2=1 µl	0,076 cM (anterior)
G10693	VIC	174-194	P3=0,5 µl	Intragénico
D17S578	NED	134-174	P4=1 µl	0,486 cM (posterior)

Tabla 3.21. Microsatélites *AIPL1*

CRB1

Macador	Fluorocromo	Tamaño	F+R [5pmol/µl]	Distancia a <i>CRB1</i>
D1S408	NED	170-186	P1=2 µl	3,297 cM (anterior)
D1S2757	6FAM	223-271	P3=2,5 µl	2,499 cM (anterior)
D1S2816	NED	210-252	P2=2,5 µl	0,587 cM (anterior)
Gen <i>CRB1</i>				
D1S1669	PET	226-250	P4=1 µl	1,200 cM (posterior)

Tabla 3.22. Microsatélites *CRB1*

CRX

Macador	Fluorocromo	Tamaño	F+R [5pmol/µl]	Distancia a <i>CRX</i>
D19S596	NED	172-190	P1=1,5 µl	0,364 cM (anterior)
D19S902	6FAM	199-217	P2=3 µl	0,005 cM (anterior)
Gen <i>CRX</i>				
D19S606	NED	213-221	P3=1,5 µl	0,908 cM (posterior)

Tabla 3.23. Microsatélites *CRX*

GUCY2D

Macador	Fluorocromo	Tamaño	F+R [5pmol/μl]	Distancia a <i>GUCY2D</i>
D17S1353	VIC	184-222	P1=1,5 μl	0,288 cM (anterior)
D17S1796	PET	177-187	P2=3 μl	0,119 cM (anterior)
Gen <i>GUCY2D</i>				
D17S786	NED	135-157	P3=1,5 μl	0,888 cM (posterior)
D17S1858	6FAM	213-263	P4=2 μl	0,944 cM (posterior)

Tabla 3.24. Microsatélites *GUCY2D****RPGRIP1***

Macador	Fluorocromo	Tamaño	F+R [5pmol/μl]	Distancia a <i>RPGRIP1</i>
D14S72	6FAM	257-271	P1=2 μl	0,385 cM (anterior)
D14S122	PET	144-174	P2=1 μl	0,378 cM (anterior)
Gen <i>RPGRIP1</i>				
D14S283	VIC	125-153	P3=1 μl	0,297 cM (posterior)
D14S1003	NED	134-174	P4=1 μl	0,868 cM (posterior)

Tabla 3.25. Microsatélites *RPGRIP1*

3100 Genetic Analyzer

<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=600530&tab=DetailInfo>

Vínculo 3.6. Secuenciador automático

3.2.3. Herramientas bioinformáticas**3.2.3.1. Herramientas *online***NCBI: www.ncbi.nlm.nih.govEnsembl: www.ensembl.orgHuman protein reference database: www.hprd.orgHapMap: <http://www.hapmap.org>Retina International: www.retina-international.orgEsRetNet: <http://www.esretnet.org>RetNet: <http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet>Evi-Genoret: <http://www.evi-genoret.org>Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW: <http://clustalw.genome.jp>

3.2.3.2. Diseño de la base de datos de distrofias de retina

Para el correcto manejo de los resultados obtenidos tras el análisis de las familias, se ha diseñado y se está empleando actualmente en el laboratorio una base de datos de Distrofias de Retina (DR), donde están incluidos tanto los datos clínicos como genéticos de los pacientes y sus familias. Esta herramienta permite optimizar el análisis de los resultados, pudiéndose estudiar varios parámetros al mismo tiempo y a su vez se pueden comparar los datos entre familias.

La base de datos de DR consta de diferentes pantallas donde se han ido añadiendo y actualizando los datos de los pacientes. El acceso a esta herramienta está restringido a los investigadores autorizados por el departamento para su uso.

3.2.3.2.1. Pantalla principal (Fig. 3.6)

La *Pantalla principal* es la pantalla de presentación de la base de datos, permite el acceso a los diferentes formularios: *Datos generales*, *Datos oftalmológicos*, *Antecedentes geográficos*, *Estudios Realizados y Resultados* y *Listados*. Desde cualquier pantalla se puede volver al *Inicio* o *Pantalla Principal*.



Figura 3.6. Pantalla principal de la base de datos

3.2.3.2.2. Datos generales (Fig. 3.7)

En esta pantalla se añaden todos los datos personales del paciente y de sus familiares, nombre, apellidos, sexo, fecha de nacimiento, parentesco con el *probandus* (paciente índice de la familia) y si está afectado o no por la misma enfermedad.

Figura 3.7. Pantalla datos generales

Se registra el número de ADN (número identificativo y codificado de cada individuo que es único del laboratorio), así como el número de familia, que es extensivo a sus familiares. A su vez se indica el tipo de DR que padece: retinosis pigmentaria, distrofia macular, atrofia óptica, entre otras, y el modo de herencia: autosómica dominante, autosómica recesiva, ligada al cromosoma X, forma esporádica, etc. Así como otros datos acerca de la procedencia de la muestra. También consta que los pacientes han firmado el correspondiente consentimiento informado (Anexo I).

Activando el botón “*Domicilio postal*” (Fig. 3.8) se rellenará la dirección de los pacientes donde quieren que les lleguen los informes médicos.

Figura 3.8. Pantalla domicilio postal

Directamente desde la pantalla de *Datos generales* se puede acceder al origen geográfico de la familia, a los datos clínicos y a los resultados genéticos del paciente.

3.2.3.2.3. Antecedentes geográficos (Fig. 3.9)

En esta pantalla se puede observar la localidad de donde proviene la familia del paciente. Se introducen las poblaciones y las provincias de los cuatro abuelos para poder hacer un estudio geográfico de las mutaciones.

Figura 3.9. Pantalla antecedentes geográficos

Los nombres del paciente y de los familiares aparecen de forma automática ya que fue en la pantalla de *Datos generales* donde se rellenaron estos datos. En esta pantalla se indica si existe algún parentesco entre los padres del paciente, y en caso de que lo haya permite indicar el grado del mismo.

En la parte inferior de la pantalla, en el botón *Árbol Familiar*, se puede insertar el árbol genealógico familiar, utilizando el programa *Cyrillic*, herramienta habitualmente utilizada en genética para la realización de genealogías. Existe otro botón donde pone *Auto Route* que es link a un programa de localización geográfica para poder situar las poblaciones de los individuos sobre un mapa y calcular las distancias entre ellos. Esta herramienta permite asociar las mutaciones a diferentes regiones geográficas y facilitar el estudio de otras familias que provienen de la misma zona.

3.2.3.2.4. Datos oftalmológicos (Fig. 3.10)

En esta pantalla se ven los datos clínicos del paciente, al tratarse de distrofias retinianas, en su mayoría son datos oftalmológicos del paciente. Los parámetros que se van a estudiar en esta parte de la base de datos han sido facilitados por el Departamento de Oftalmología de la Fundación Jiménez Díaz.

En la pantalla principal de *Oftalmología* se incluye la *Historia Oftalmológica* y la *Historia Sistémica* del paciente. En la parte inferior hay diferentes botones que corresponden a las partes del examen oftalmológico: desde éstos se accede a los formularios que permiten completar la historia oftalmológica. Éstas pantallas se detallan en las figuras 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16, 3.17, 3.18, 3.19, 3.20 y 3.21.

OFTALMOLOGÍA ADN:

Historia Oftalmológica

Diagnóstico previo: Edad al Diagnóstico:

Sintomas actuales o motivo de la consulta al oftalmólogo:

☐ Síntomas de Ceguera Nocturna Edad
☐ Síntomas de Disminución de Campo Visual Edad
☐ Síntomas de Disminución de Agudeza Visual Edad
☐ Fotofobia
☐ Alteración en la percepción de los Colores
☐ Fotopsias

Otros Síntomas: Curso

Otros antecedentes oftalmológicos:

Historia Sistémica

☐ Hipoacusia Gravedad Edad de inicio:
☐ Obesidad
☐ Diabetes
☐ Otras enfermedades endocrinológicas
☐ Retraso mental
☐ Malformaciones congénitas
☐ Alergias
☐ Cirugías
☐ Otras enfermedades
☐ Fármacos actuales

Examen Oftalmológico

Agudeza Visual	Biomicroscopía del segmento anterior	Varios	Fondo de Ojo	Campo Visual	Otras pruebas	Electrorretinograma	Electrooculograma	Potenciales evocados	Diagnósticos	Fotos
----------------	--------------------------------------	--------	--------------	--------------	---------------	---------------------	-------------------	----------------------	--------------	-------

Agudeza visual
 Biomicroscopía del segmento anterior
 Varios
 Fondo de Ojo
 Campo Visual
 Otras pruebas
 Electrorretinograma
 Electrooculograma
 Potenciales evocados
 Diagnósticos
 Fotos

Figura 3.10. Pantalla datos clínicos

AGUDEZA VISUAL

ADN: Fecha:

Agudeza Visual:

OD:

OS:

Mejor Agudeza Visual Corregida:

OD:

OS:

Refracción (para la que se consigue la MÁX. En caso de refractómetro automático u otra corrección, especificar):

OD: Esfera: Cilindro: Eje: Otra:

OS: Esfera: Cilindro: Eje: Otra:

Especificaciones:

Figura 3.11. Pantalla agudeza visual

BIOMICROSCOPIA DEL SEGMENTO ANTERIOR

ADN: Fecha:

Configuración:

Comas:

Nie:

Cristalino:

☐ Normal ☐ Ojo derecho ☐ Normal ☐ Ojo izquierdo

☐ Catarata ☐ Catarata

Descripción:

Descripción:

☐ Albugo ☐ Albugo

☐ Pseudoflujea ☐ Pseudoflujea

Descripción:

Descripción:

Explorador:

Figura 3.12. Pantalla biomicroscopía del segmento anterior

VARIOS

ADN: Fecha:

Mediosidad Ocular:

☐ Normal ☐ Esclerótica Descripción:

☐ Heterotopía Descripción:

Pupilas:

☐ Normal ☐ Anómala Descripción:

Presión Intraocular:

Ojo derecho:

Ojo izquierdo:

Párpados, Músculos Laciales y Órbita:

☐ Normal ☐ Anómala Descripción:

Explorador:

Figura 3.13. Pantalla varios

FONDO DE OJO

ADN: Fecha:

PAPILAS

Ojo derecho: ☐ Normal ☐ Pálida ☐ Otras:

Ojo izquierdo: ☐ Normal ☐ Pálida ☐ Otras:

VASOS

Ojo derecho: ☐ Normal ☐ Constricción de calibre ☐ Otras:

Ojo izquierdo: ☐ Normal ☐ Constricción de calibre ☐ Otras:

RETINA

Ojo derecho: ☐ Normal ☐ Píndulo ☐ Otras:

Ojo izquierdo: ☐ Normal ☐ Píndulo ☐ Otras:

MÁCULA

Ojo derecho: ☐ Normal ☐ Alteración EPR ☐ Otras:

Ojo izquierdo: ☐ Normal ☐ Alteración EPR ☐ Otras:

VÍTREO

Ojo derecho: ☐ Normal ☐ Anómala ☐ Otras:

Ojo izquierdo: ☐ Normal ☐ Anómala ☐ Otras:

FOTOS de FO: ☐ ¿Hay fotos? ☐

Figura 3.14. Pantalla fondo de ojo

CAMPO VISUAL

ADN: Fecha:

Ojo derecho:

☐ Normal ☐ Escotomas Relativos Difusos ☐ Constricción Periférica ☐ Escotoma Anular ☐ Tubular Con lóbulos ☐ Tubular ☐ Escotoma Absoluto ☐ Otras:

Ojo izquierdo:

☐ Normal ☐ Escotomas Relativos Difusos ☐ Constricción Periférica ☐ Escotoma Anular ☐ Tubular Con lóbulos ☐ Tubular ☐ Escotoma Absoluto ☐ Otras:

Explorador:

Figura 3.15. Pantalla campo visual

OTRAS PRUEBAS

ADN: Fecha:

Test de Colores: ☐

28 HUS Flammarion:

15 HUS Desatino:

Otras:

Explorador:

Angiofluoresceografía:

Fecha:

¿Hay fotos? ☐

Explorador:

Adaptometría:

☐

Test de Sensibilidad al Contraste:

☐

SLO:

☐

Informes de otros hospitales:

☐

Figura 3.16. Pantalla otras pruebas

ELECTORRETINOGRAMA

ADN:
Fecha:

Características:
☒ Estimación de campo completo (periférico) Protocolo ISCEV Equipo LVC (Jáen 2000) y electrodos corneales Herkles. Adaptación a la oscuridad 30m.
 Densidad pupilar:
 - Otros:

Resultados:

Bastones		Mixo (Bastones Conos)		Pst. Ond. C		Conos		Flicker 30 Hz	
Onda 1	Onda 2	Onda 1	Onda 2	Onda 1	Onda 2	Onda 1	Onda 2	Onda 1	Onda 2
AMPL	TMP	AMPL	TMP	AMPL	TMP	AMPL	TMP	AMPL	TMP
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

☐ Ojo Derecho ☐ Ojo Izquierdo
☐ Normal ☐ Anormal ☐ No válido

Comentarios:

Explorador:

Figura 3.17. Pantalla electrorretinograma

ELECTROOCULOGRAMA

ADN:
Fecha:

Características:
☒ Protocolo ISCEV Equipo LVC Uten 2000. Distorsión pupilar ☒
 - Otros:

Resultados:

☒ Ojo Derecho ☒ Normal ☐ Anormal ☐ No válido
☒ Ojo Izquierdo ☒ Normal ☐ Anormal ☐ No válido

Comentarios:

Explorador:

Figura 3.18. Pantalla electrooculograma

POTENCIALES EVOCADOS

ADN:
Fecha:

Características:
☒ PEV CHAMBERL. Oblemas laterales de generos reversibles. PEV FLASH. Estimación de campo completo (periférico).
 Electrodos: de superficie o de aguja. LVC. Cu Cu. Protocolo ISCEV.
 - Otros:

Resultados: onda P 100:

PEV Patto						PEV Flash					
Sub	100/10	100/10	100/10	100/10	100/10	Sub	100/10	100/10	100/10	100/10	100/10
Ampl	L.R	Ampl	L.R	Ampl	L.R	Ampl	L.R	Ampl	L.R	Ampl	L.R
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

☐ Ojo Derecho ☐ Ojo Izquierdo
☐ Normal ☐ Anormal ☐ No válido

Comentarios:

Explorador:

Figura 3.19. Pantalla potenciales evocados

DIAGNÓSTICOS

ADN:

Diagnóstico 1: Fecha: Examinador:

Diagnóstico 2: Fecha: Examinador:

Diagnóstico 3: Fecha: Examinador:

Comentarios:

Figura 3.20. Pantalla diagnósticos

FOTOGRAFÍAS

ADN:

Foto01: Foto06: Foto11:

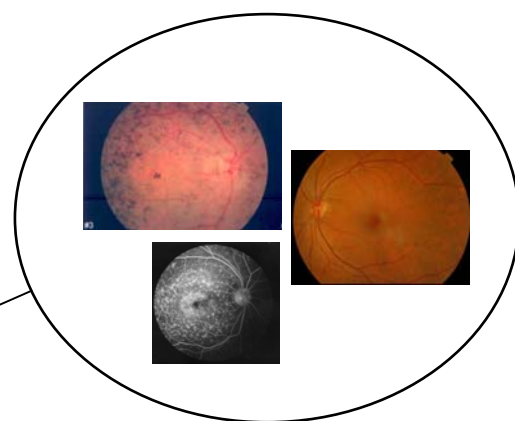
Foto02: Foto07: Foto12:

Foto03: Foto08: Foto13:

Foto04: Foto09: Foto14:

Foto05: Foto10: Foto15:

Figura 3.21. Pantalla fotografías



En esta parte del cuestionario, se pueden introducir fotos de fondo de ojo, angiografías, entre otros. Esto permitirá tanto al oftalmólogo como a otros especialistas ver los resultados de las pruebas.

3.2.3.2.5. Resultados (Fig. 3.22)

En esta pantalla los datos que se añaden los resultados obtenidos en el laboratorio. Se marcan los estudios realizados poniendo el resultado de los mismos, tanto si son negativos como positivos.

Figura 3.22. Pantalla resultados

Dentro de cada uno de los estudios realizados, se puede ver con detalle el tipo y la fecha de la prueba; esto permite tener muchos más detalles sobre el estudio y permite la trazabilidad de las pruebas realizadas.

A continuación un ejemplo: muestras enviadas para estudio con el microarray LCA (Fig. 3.23).

Figura 3.23. Pantalla estudio con microarray LCA

En el apartado de *Mutaciones* encontradas se ponen de forma conjunta todas las mutaciones encontradas en el paciente, lo que permite un acceso a los datos mucho más rápido cuando se quiera saber cuáles son los estudios realizados en el paciente y cuáles son las mutaciones responsables de su distrofia de retina.

Cuando estén añadidos los datos de los pacientes, volviendo a la pantalla principal, se puede acceder a los informes.

3.2.3.2.6. Pantalla de listados (Fig. 3.24)



Figura 3.24. Pantalla listados

En esta pantalla, se encontraran combinaciones de parámetros ya establecidas, pero a su vez se pueden ir creando otras nuevas. Como, por ejemplo, un listado de todas las familias que tengan mutaciones en el gen *CRB1* (Fig. 3.25).

Mutantes en CRB1

ID	AP	LCA	Mutación 1	Mutación 2	Mutación 3	Paciente	
001	María	0	8481C>	1147T>	0	0	Problema visual
002	María	0	8481C>	8151C>	0	0	Problema visual
003	María	0	8481C>	8481C>	0	0	Problema visual
004	María	0	8481C>	8481C>	0	0	Problema visual
005	María	0	8481C>	8481C>	0	0	Problema visual
006	María	0	8481C>	8481C>	0	0	Problema visual
007	María	0	8481C>	8481C>	0	0	Problema visual
008	María	0	8481C>	8481C>	0	0	Problema visual
009	María	0	8481C>	8481C>	0	0	Problema visual
010	María	0	8481C>	8481C>	0	0	Problema visual
011	María	0	8481C>	8481C>	0	0	Problema visual
012	María	0	8481C>	8481C>	0	0	Problema visual
013	María	0	8481C>	8481C>	0	0	Problema visual
014	María	0	8481C>	8481C>	0	0	Problema visual
015	María	0	8481C>	8481C>	0	0	Problema visual

Seleción de

Seleción de

Página 1 de 1

Seleción de
Seleción de

Página 1 de 1

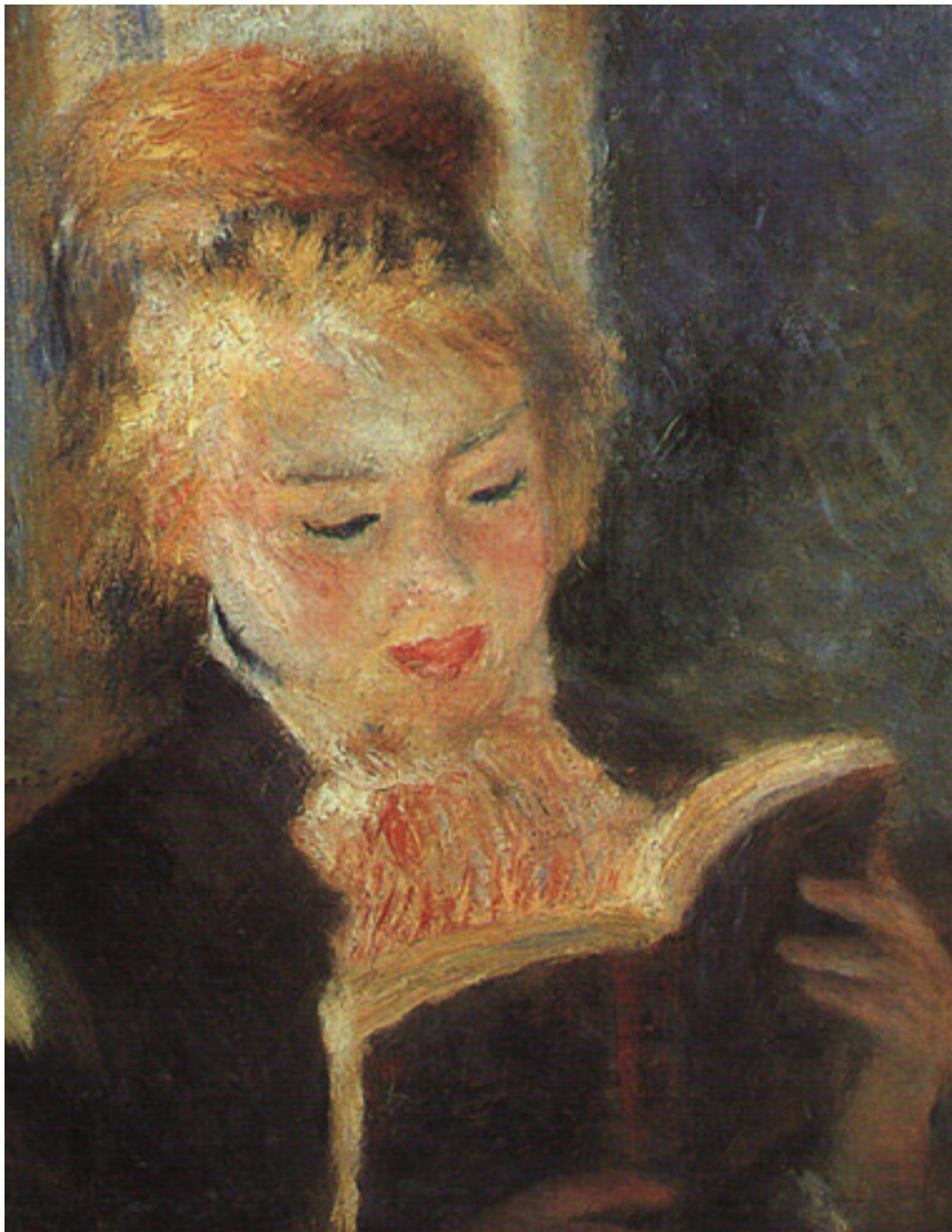
Seleción de
Seleción de

Página 1 de 1

Figura 3.25. Listados obtenidos con la base de datos.

O un listado con todas las muestras enviadas al microarray de LCA, con los resultados obtenidos más la procedencia geográfica de la familia. De esta forma se puede hacer todas las combinaciones posibles para sacarle más partido a los datos y poder llegar a obtener resultados más rápidamente que cuando se analizan datos por separado.

Esta base de datos de distrofias de retina permite el manejo de los datos con gran eficacia, pudiendo llegar más rápido a descubrir la causa genética, ya que en una misma herramienta se combinan datos clínicos (oftalmológicos y sistémicos), datos geográficos y datos moleculares.



“La lectora”

Pierre-Auguste Renoir, 1975 – 1976

RESULTADOS

4.1. Esquema general de resultados

Para hacer más fácil la comprensión de este apartado se exponen a continuación los diferentes puntos en que se dividen los resultados obtenidos en este trabajo.

Este apartado consta de dos partes principales, la primera es el análisis y validación de los resultados obtenidos en el cribado inicial con el microarray de LCA con el fin de establecer el papel de las mutaciones más frecuentes. La segunda parte es el estudio familiar en base a los hallazgos hechos con el microarray.

Tras el análisis de los resultados obtenidos con el microarray de LCA se ha observado una frecuencia de mutaciones que se puede observar en la tabla 4.1.

A	Familias con mutación/es	Total familias	B	Alelos mutados	Total alelos
LCA	19 (38,8%)	49	LCA	25 (25,6%)	98
RP-IP	29 (22,7%)	128	RP-IP	30 (11,7%)	256

Tabla 4.1. Análisis de resultados obtenidos exclusivamente con el microarray de LCA. **(A)** Porcentaje de familias con al menos una mutación en pacientes con LCA y RP-IP. **(B)** Porcentaje de alelos mutados en pacientes con LCA y RP-IP.

A su vez se ha visto que 3 de los cambios que detecta esta herramienta no son mutaciones patogénicas sino cambios polimórficos o mutaciones con un efecto modificador del fenotipo. En base a estos resultados y a las mutaciones encontradas se llevó a cabo un nuevo análisis de los resultados obtenidos sin tener en cuenta estos tres polimorfismos, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.2.

A	Familias con mutación/es	Total familias	B	Alelos mutados	Total alelos
LCA	19 (34,7%)	49	LCA	27 (27,6%)	98
RP-IP	19 (14,8%)	128	RP-IP	21 (8,2%)	256

Tabla 4.2. Resultados obtenidos tras el análisis de los datos familiares sin considerar los cambios polimórficos o modificadores del fenotipo. **(A)** Porcentaje de familias con al menos una mutación en pacientes con LCA y RP-IP. **(B)** Porcentaje de alelos mutados en pacientes con LCA y RP-IP.

Esta información ha servido para conocer la implicación de cada uno de los genes en la LCA y RP-IP de pacientes españoles, revelándose *CRB1* como el gen con mayor tasa de mutación en LCA (20,41%) y en RP-IP (6,25%).

Para el estudio familiar se han tenido en cuenta todos los cambios observados, ya que su papel puede ser el de modificar el fenotipo.

De las 48 familias con mutaciones y cambios polimórficos o modificadores (19 en LCA y 29 en RP-IP), 39 presentaban mutaciones en un solo gen mientras que 9 familias presentaban mutaciones en dos genes diferentes (Tabla 4.3).

<i>AIPL1</i>	1 / 7										
<i>CEP290</i>	0 / 0	2 / 1									
<i>CRB1</i>	0 / 0	0 / 0	7 / 5								
<i>CRX</i>	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 2							
<i>GUCY2D</i>	0 / 0	0 / 0	2 / 0	0 / 0	0 / 3						
<i>LRAT</i>	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0					
<i>MERTK</i>	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0				
<i>RDH12</i>	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	1 / 1			
<i>RPE65</i>	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
<i>RPGRIP1</i>	0 / 0	2 / 0	1 / 3	0 / 1	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	3 / 6	
<i>TULP1</i>	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0
	<i>AIPL1</i>	<i>CEP290</i>	<i>CRB1</i>	<i>CRX</i>	<i>GUCY2D</i>	<i>LRAT</i>	<i>MERTK</i>	<i>RDH12</i>	<i>RPE65</i>	<i>RPGRIP1</i>	<i>TULP1</i>

Tabla 4.3. Representación de las 48 familias con mutaciones/cambios polimórficos, siendo el numerador “Nº de familias LCA” y el denominador “Nº de familias RP-IP”. Hay 39 familias con mutaciones en 1 gen y 9 familias con mutaciones en 2 genes diferentes.

En el grupo con mutaciones en dos genes se ha estudiado la posibilidad de una herencia digénica o trialélica de la enfermedad.

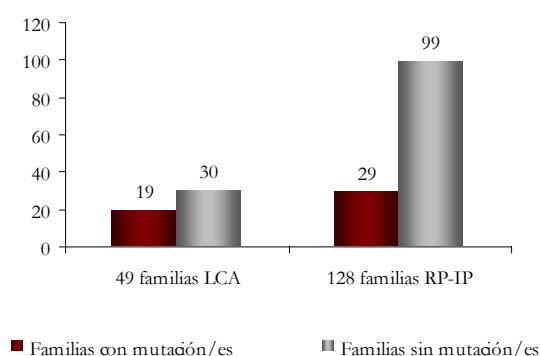
A su vez se ha estudiado el origen de dos cambios muy frecuentes encontrados en nuestra población, *RPGRIP1* (p.Asp1114Gly) se concentra en dos regiones geográficas principales del territorio español y el estudio de haplotipos mediante SNPs intragénicos ha revelado la asociación de un SNPs intragénico con este cambio. La mutación *CRB1* (p.Cys948Tyr) se reparte por toda España sin una localización geográfica concreta pero el estudio mediante microsatélites ha puesto de manifiesto un origen común de dicha mutación.

Finalmente se ha llevado a cabo un estudio de correlación genotipo-fenotipo en los genes *CRB1*, *CEP290* y *RDH12*.

4.2. Estudio directo: microarray LCA en familias LCA y RP-IP

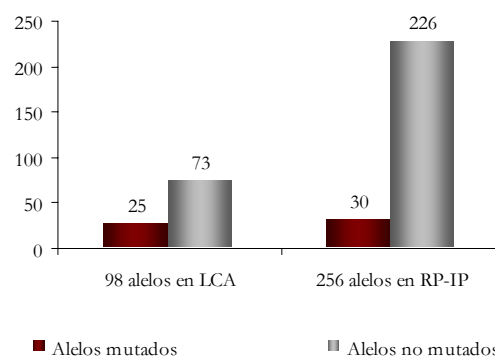
Los resultados obtenidos con el microarray LCA se muestran en la figura 4.1 (A1 y A2). A su vez se hizo una relación de todas las mutaciones encontradas tanto en pacientes LCA como RP-IP de forma conjunta (Fig. 4.1, B). Se observó que había 4 mutaciones que era más recurrentes que las demás, lo que llevó a la realización de un análisis en controles de estos cambios para ver su prevalencia en población sana.

A1 Familias LCA y RP-IP con al menos 1 mutación



A2

Alelos mutados



B

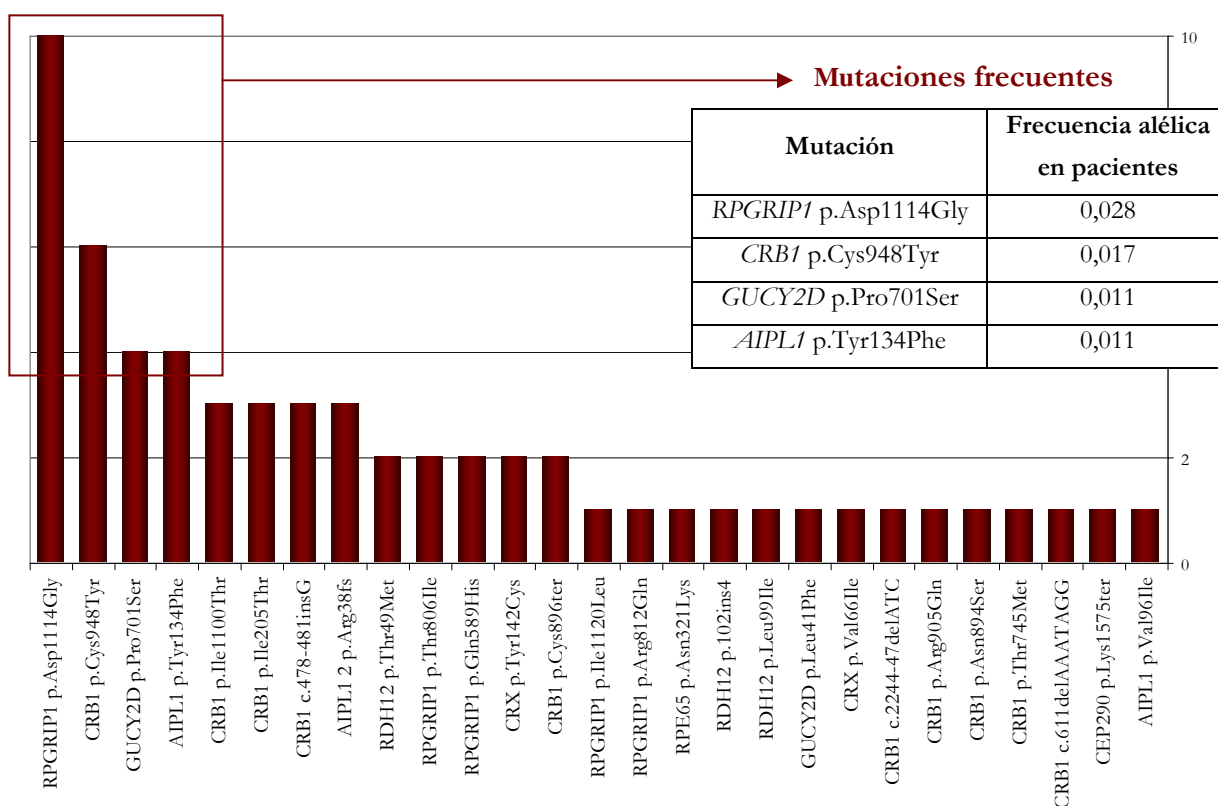


Figura 4.1. (A) Resultados obtenidos tras el análisis con el microarray de LCA. (A1) Porcentaje de familias con al menos una mutación en los grupos LCA y RP-IP. (A2) Porcentaje de alelos mutados en familias LCA y RP-IP. (B) Relación de mutaciones encontradas con el microarray LCA de todas las familias presentadas en este manuscrito y frecuencias alélicas de las mutaciones más frecuentes.

Se llevó a cabo un análisis *chi*-cuadrado para el estudio estadístico de las cuatro mutaciones frecuentes establecidas según la figura 4.1., el objetivo de dicho análisis es determinar si las dos variables cualitativas están o no asociadas. Por lo tanto, se establecerá si se trata mutaciones patogénicas o por el contrario pueden ser modificadores del fenotipo o simplemente polimorfismos proteicos aunque no estén descritos como tales. Los resultados de dicho análisis se muestran en la tabla 4.4.

A. *RPGRI1* p.Asp1114Gly

	Pacientes	Controles	Total
Con mutación	10	2	12
Sin mutación	344	222	566
Total	354	224	578

$X^2 = 2,52 // p = 0,1125$ (NS)

	Pacientes	Controles
Frecuencia alélica	0,028	0,009

B. *CRB1* p.Cys948Tyr

	Pacientes	Controles	Total
Con mutación	6	0	6
Sin mutación	348	284	632
Total	354	284	638

$X^2 = 4,86 // p = 0,0275$ ($p < 0,05^*$)

	Pacientes	Controles
Frecuencia alélica	0,017	0

C. *GUCY2D* p.Pro701Ser

	Pacientes	Controles	Total
Con mutación	4	1	5
Sin mutación	350	199	549
Total	354	200	554

$X^2 = 0,57 // p = 0,4514$ (NS)

	Pacientes	Controles
Frecuencia alélica	0,011	0,005

D. *AIPL1* p.Tyr134Phe

	Pacientes	Controles	Total
Con mutación	4	1	5
Sin mutación	350	189	539
Total	354	190	544

$X^2 = 0,49 // p = 0,4818$ (NS)

	Pacientes	Controles
Frecuencia alélica	0,011	0,005

Tabla 4.4. A la vista de los resultados, para una seguridad del 95% ($\alpha = 0,05$) el valor teórico de una distribución *chi*-cuadrado con una grado de libertad es 3,84, por lo que no hay diferencias entre unos datos obtenidos en los pacientes y en los controles (**A**, **C** y **D**), excepto para la mutación *CRB1* p.Cys948Tyr (**B**).

Los resultados obtenidos tras el estudio estadístico y familiar indican que los cambios *RPGRIP1* p.Asp1114Gly, *GUCY2D* p.Pro701Ser y *AIPL1* p.Tyr134Phe no se presentan de forma significativamente más frecuente en la población afecta, por lo que no se tendrán en cuenta para el estudio estadístico de los genes implicados en la LCA y RP-IP, considerándose polimórficos o modificadores del fenotipo.

4.3. Estudio familiar

A continuación se detallan las características de las familias estudiadas, en segundo lugar el estudio de haplotipos realizado en las familias que presentan las mutaciones frecuentes citadas en el apartado anterior y finalmente se desarrollará el estudio realizado en cada familia según los genes responsables de la LCA o RP-IP. Debido al elevado número de familias estudiadas, los resultados se expondrán en base al gen mutado y el fenotipo. En los casos de familias con mutaciones en 2 genes diferentes, se detallarán en el apartado del gen con mayor tasa de mutación.

4.3.1. Familias consanguíneas y/o endogámicas

De las 49 familias con fenotipo LCA, en 4 de ellas, un 8,16%, los padres presentaban consanguinidad, mientras que en las 128 familias con RP-IP, en 30 los padres eran consanguíneos, es decir, un 23,44%, ver figura 4.2.

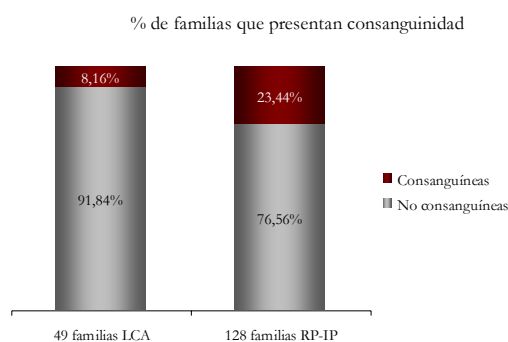


Figura 4.2. Familias que presentan consanguinidad según el fenotipo.

Se ha visto a su vez la relación de familias que presentaban consanguinidad y endogamia, es decir *probandus* que sean hijos de matrimonios donde la pareja tenga ascendencia común o sean naturales de una pequeña localidad o comarca. En este caso, el porcentaje obtenido en familias con fenotipo LCA es casi del 25%, mientras que en las familias RP-IP este porcentaje se eleva a poco más del 43% (Fig. 4.3).

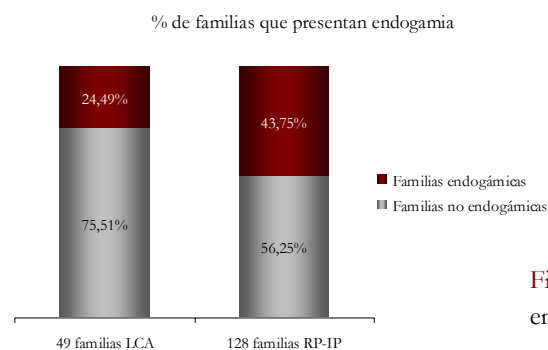
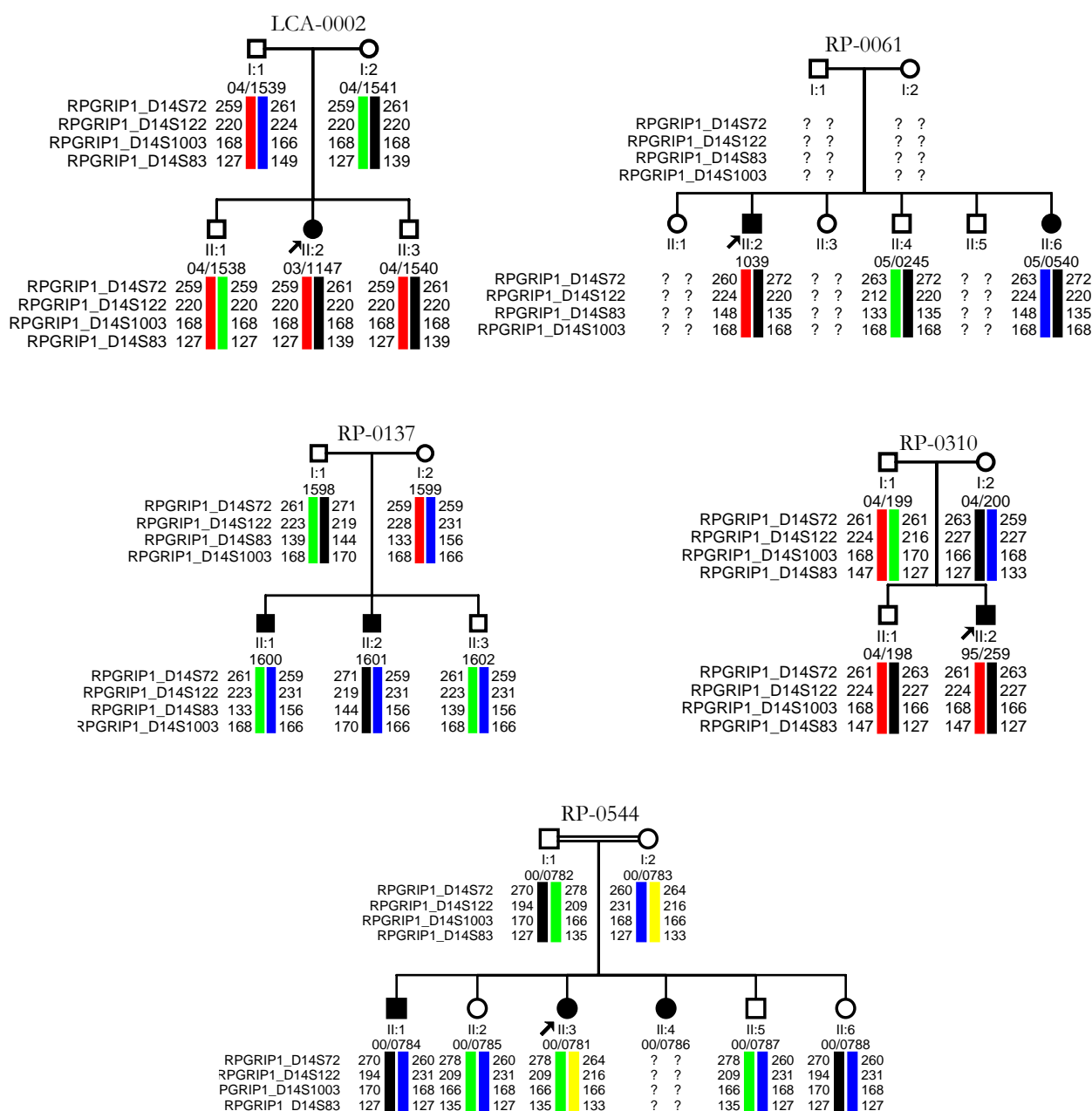


Figura 4.3. Familias que presentan endogamia según el fenotipo.

4.3.2. Mutaciones frecuentes

Se llevó a cabo un estudio de haplotipos mediante microsatélites en las familias que presentaban las mutaciones frecuentes estimadas con el microarray.

En la figura 4.4 se representan los haplotipos asociados al cambio *RPGRIP1* p.Asp1114Gly en las familias que presentan dicho cambio. Se observa que en la RP-0061, RP-0137 y RP-0544 se puede descartar este gen como responsable de la patología, mientras que en el resto de las familias no hay datos suficientes para descartar su implicación.



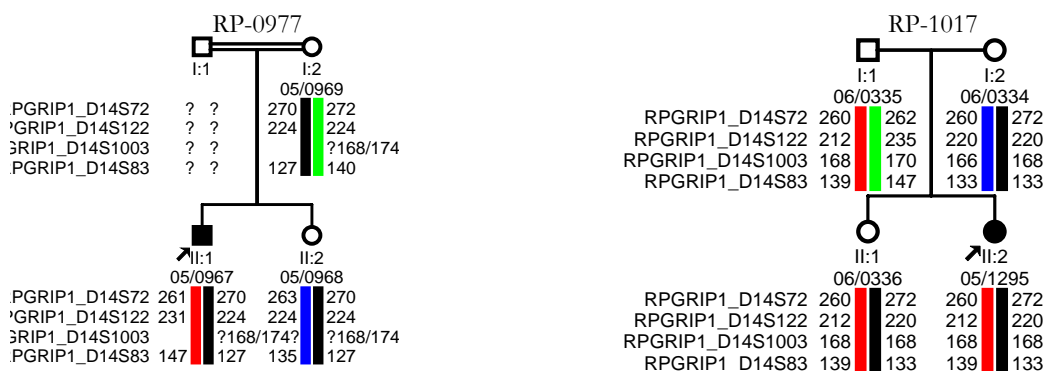
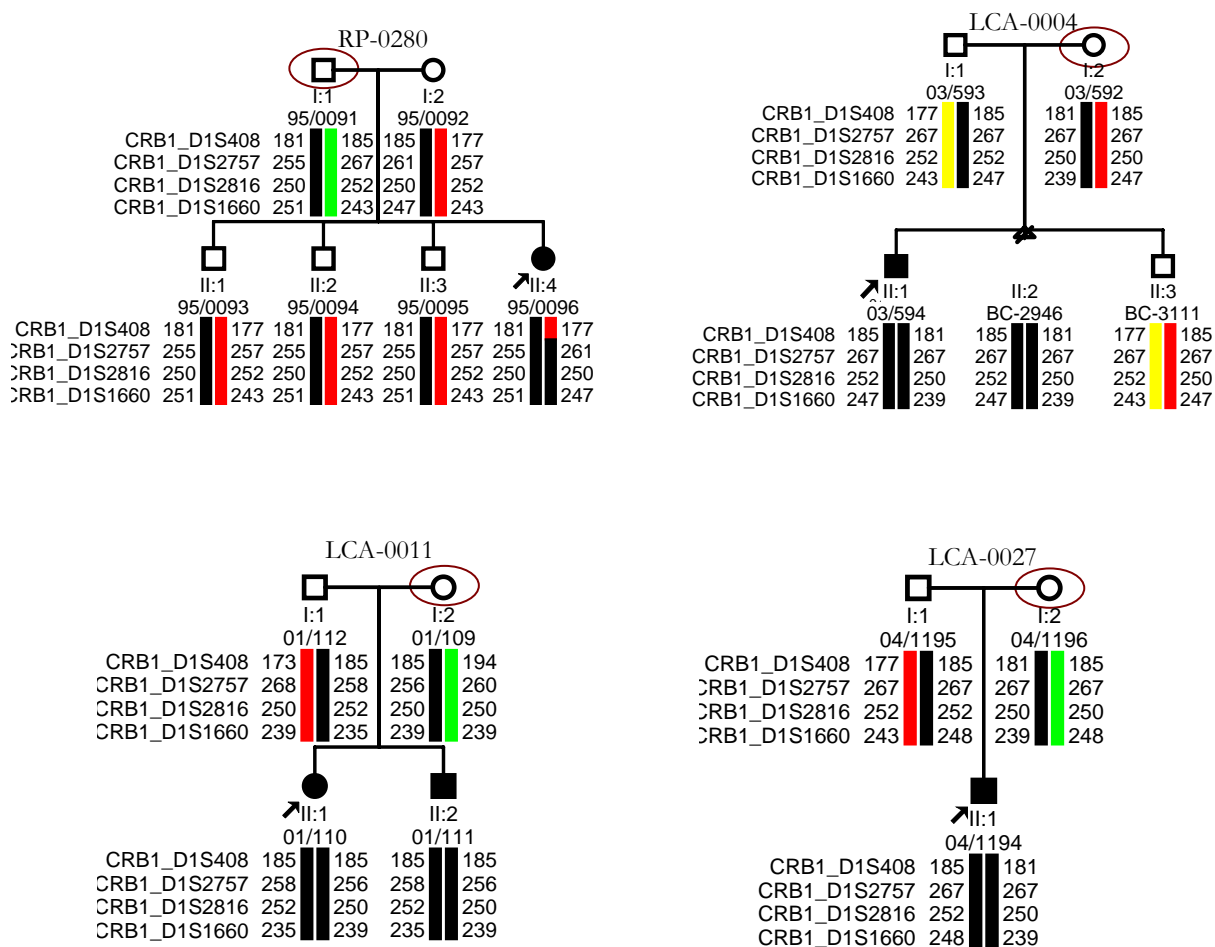


Figura 4.4. Familias que presentan el cambio p.Pro701Ser. Estudio con microsatélites de RPGRIP1. No se presentan los haplotipos de las familias RP-1003, RP-0621 y LCA-0034 ya que se dispone solamente del ADN del *probandus*.

Para la mutación en *CRB1* p.Cys948Tyr se ha estudiado su segregación en las familias que presenta este cambio (Fig. 4.5). Se puede observar que la mutación cosegrega en todas las familias estudiadas.



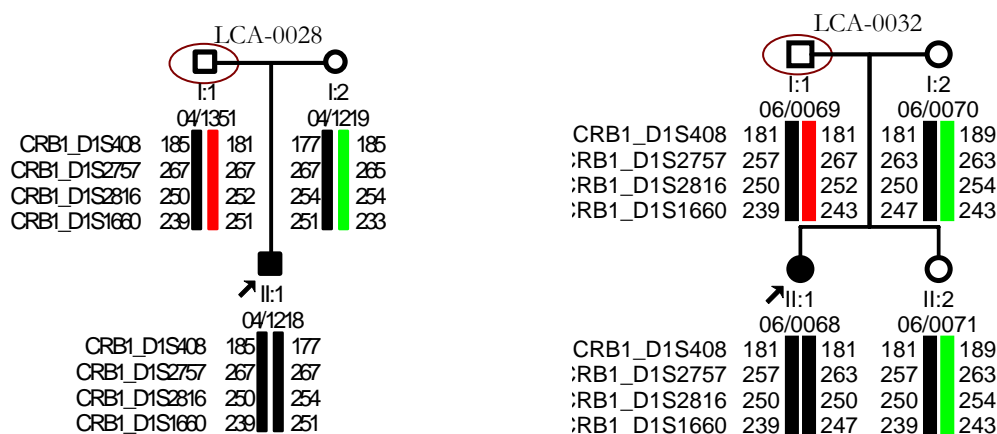


Figura 4.5. Segregación de microsatélites de CRB1 en familias con mutación p.Cys948Tyr. El círculo burdeos indica qué progenitor porta la mutación p.Cys948Tyr. Los haplotipos marcados en negro van asociados a las mutaciones encontradas.

El estudio familiar del cambio *AIPL1* p.Tyr134Phe se ha podido estudiar únicamente en la familia R-0082 debido a la falta de familiares en el resto de las familias que presentaban este cambio. Se puede observar en la figura 4.6 que no se puede descartar la implicación de este gen en la patología de la familia.

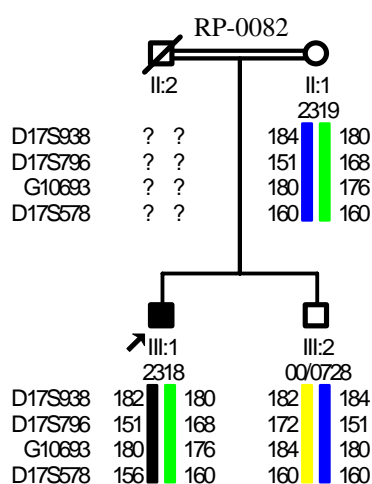


Figura 4.6. Familia RP-0082 que presenta el cambio p.Tyr134Phe en el gen *AIPL1*. No se presentan los haplotipos de las familias RP-0029, RP-0882 y LCA-0978 ya que se dispone solamente del ADN del *probandus*. El haplotipo marcado en negro es el que va asociado a la mutación.

En el caso del cambio *GUCY2D* p.Pro701Ser, se han estudiado mediante microsatélites 3 de las familias que presentan este cambio y que el número de familiares ha permitido hacer el estudio mediante haplotipos. La figura 4.7 representa dichos árboles donde se puede observar que en el caso de LCA-0012 los haplotipos de los afectados son iguales entre sí y a su vez diferentes al de la hermana sana, lo que no permite descartar este gen como responsable de la enfermedad en la familia.

En las otras dos familias, RP-0591 y RP-0933 tampoco se puede descartar la implicación de *GUCY2D* en la RP-IP ya que sólo hay un afectado en la familia y al conocerse sólo una mutación no se puede saber si la segunda que presenta es heredada o de *novo* por lo que los haplotipos no pueden dar la información suficiente.

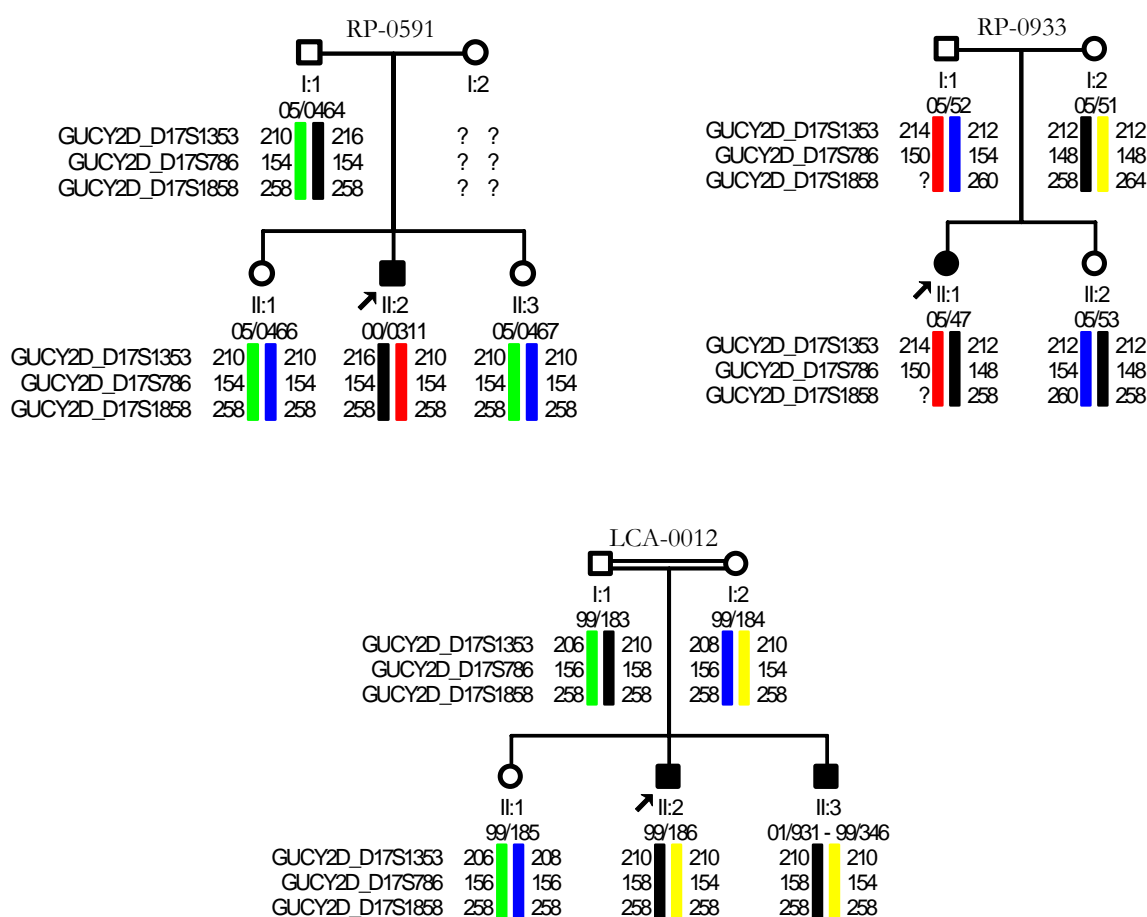


Figura 4.7. Familias que presentan el cambio p.Pro701Ser. Estudio con microsatélites de *GUCY2D*. No se presentan los haplotipos de la familia LCA-0042 ya que presenta sólo el *probandus*. Los haplotipos marcados en negro van asociados a las mutaciones encontradas.

4.3.3. Cribado de genes

4.3.3.1. Estudio del gen *CRB1*

Las familias con mutaciones exclusivamente en el gen *CRB1*, se representan en la tabla 4.5, divididas en dos grupos, fenotipo LCA y fenotipo RP-IP. A su vez, las familias que presentan mutaciones en *CRB1* y otro gen, se detallan en la tabla 4.6, divididas en base al fenotipo de los pacientes.

Tabla 4.5. Familias LCA y RP-IP con mutaciones en *CRB1*

Familia	ADN	Mutación 1	Mutación 2	Est. familiar
LCA-0010	02/0668	<i>CRB1</i> c.478-481insG	<i>CRB1</i> c.478-481insG	C
LCA-0019	04/0375	<i>CRB1</i> c.611delAAATAGG	<i>CRB1</i> c.2227delG ^N	C
LCA-0004	03/0594	<i>CRB1</i> p.Cys896ter	<i>CRB1</i> p.Cys948Tyr	C
LCA-0011	01/0111	<i>CRB1</i> p.Cys948Tyr	<i>CRB1</i> c.2244-47delATC	C
LCA-0027	04/1194	<i>CRB1</i> p.Cys948Tyr	<i>CRB1</i> p.Glu1330ter ^N	C
LCA-0028	04/1218	<i>CRB1</i> p.Cys948Tyr	<i>CRB1</i> p.Ile1100Thr	C
LCA-0032	06/0068	<i>CRB1</i> p.Cys948Tyr	<i>CRB1</i> p.Leu535Pro ^N	C
RP-0025	2003	<i>CRB1</i> p.Ile1100Thr	<i>CRB1</i> p.Ile1100Thr	NF
RP-0280	95/0096	<i>CRB1</i> p.Cys948Tyr	<i>CRB1</i> p.Trp822ter ^N	C
RP-0091	2665	<i>CRB1</i> c.478-481insG	-----	ND
RP-0457	98/0299	<i>CRB1</i> p.Asn894Ser	-----	NF
RP-0617	00/0572	<i>CRB1</i> p.Arg1331His	-----	NF

(^N) - Mutación descrita por primera vez

C – Cosegrega con la enfermedad

NC – No cosegrega

ND – No se puede descartar que cosegregue

NF – No hay familia para realizar el estudio

Tabla 4.6. Familias LCA y RP-IP digénicas/trialélicas con *CRB1* implicado

Familia	ADN	Mutación 1	Mutación 2	Mutación 3	Estudio familiar	
					<i>CRB1</i>	2º gen
LCA-0038_1	04/1357	<i>CRB1</i> p.Cys896ter	<i>CRB1</i> p.Ile1001Asn ^N	<i>RPGRIP1</i> p.Gln589His	C	NC
LCA-0038_2	03/0945	<i>CRB1</i> p.Ile1001Asn ^N	<i>CRB1</i> p.Asp564Thr ^N	<i>RPGRIP1</i> p.Gln589His	C	NC
LCA-0012	99/0186	<i>CRB1</i> p.Ile205Thr	<i>GUCY2D</i> p.Pro701Ser	----	C	C
LCA-0042	06/0067	<i>CRB1</i> p.Ile205Thr	<i>GUCY2D</i> p.Pro701Ser	----	NF	NF
RP-0310	95/0259	<i>CRB1</i> p.Ile205Thr	<i>RPGRIP1</i> p.Asp1114Gly	----	ND	ND
RP-0137	1601	<i>CRB1</i> p.Arg905Gln	<i>RPGRIP1</i> p.Asp1114Gly	----	NC	NC
RP-1017	05/1295	<i>CRB1</i> p.Thr745Met	<i>RPGRIP1</i> p.Asp1114Gly	----	ND	ND

(^N) - Mutación descrita por primera vez

C – Cosegrega con la enfermedad

NC – No cosegrega

ND – No se puede descartar que cosegregue

NF – No hay familia para realizar el estudio

De las mutaciones nuevas encontradas se ha realizado el estudio de p.Ile1100Thr, p.Leu535Pro y p.Ile1001Asn en 100 controles, no encontrándose en ninguno de ellos la alteración. Mientras que los cambios (c.2227delG, p.Glu1330ter y p.Trp822ter) no se han estudiado en población sana ya que alteran el marco de lectura o son un codón de parada prematuro y por lo tanto no es necesario.

A su vez se realizó también el estudio de la mutación p.Ile205Thr en 100 controles, para discutir su papel patogénico, siendo todos negativos.

Familia LCA-0010 (tabla 4.5)

Esta familia presenta una mutación en homocigosis (c.478-481insG) en el gen *CRB1* que fue detectada por el chip. Mediante el estudio de haplotipos y la secuenciación de esta mutación se estableció el genotipo del resto de los familiares y se vio que ambas mutaciones eran heredadas.

Familia LCA-0019 (tabla 4.5)

El estudio con el chip detectó la mutación c.611delAAATAGG en el gen *CRB1* en heterocigosis. Tras el análisis familiar con microsatélites y confirmar que ambos

afectos compartían los mismos haplotipos, se secuenció el gen *CRB1* encontrándose la segunda mutación causante de la LCA, c.2227delG [Vallespín *et al.*, 2006c]. Este diagnóstico permitió confirmar el estatus de afecto en el hermano del paciente índice que presentaba algunos rasgos clínicos de LCA pero aún no tenía un diagnóstico clínico claro.

Familia LCA-0004 (tabla 4.5)

En la familia LCA-0004 el análisis con el microarray LCA detectó dos mutaciones en el gen *CRB1* (p.Cys896Ter y p.Cys948Tyr). Se realizó estudio de haplotipos y secuenciación automática y se confirmó que cada una de las mutaciones provenía de uno de los padres del afecto, es decir, eran heredadas. Más tarde se realizó un estudio prenatal de un segundo embarazo de la pareja que mostró que el feto portaba ambas mutaciones al igual que su hermano. Posteriormente en un tercer embarazo el feto era sano, portando ambos alelos sin la mutación.

Familia LCA-0011 (tabla 4.5)

Ambos afectos de la familia LCA-0011 son heterocigotos compuestos para dos mutaciones en el gen *CRB1* (p.Cys948Tyr y c.2244-47delATC). El resultado se confirmó mediante secuenciación automática y se realizó el análisis de haplotipos, confirmándose la segregación de estas mutaciones con la enfermedad.

Familia LCA-0027 (tabla 4.5)

En esta familia se detectó una mutación en heterocigosis con el microarray LCA (p.Cys948Tyr). El análisis de haplotipos no era informativo ya que la familia tiene un sólo hijo, el afecto. El análisis del gen *CRB1* demostró que el paciente presentaba otra mutación en heterocigosis: p.Glu1330Ter [Vallespín *et al.*, 2006a].

Familia LCA-0028 (tabla 4.5)

En la familia LCA-0004 el análisis con el microarray LCA mostró dos mutaciones en el gen *CRB1* (p.Cys948Tyr y p.Ile1100Thr). Se realizó estudio de haplotipos y secuenciación automática y se confirmó que cada una de las mutaciones provenía de uno de los padres del afecto.

Familia LCA-0032 (tabla 4.5)

En esta familia, se detectó una mutación en *CRB1* en heterocigosis mediante el chip (p.Cys948Tyr), y tras realizar el estudio por secuenciación del gen *CRB1* se encontró una segunda mutación responsable del fenotipo del paciente: *CRB1* 6 c.1604T>C p.Leu535Pro [Vallespín *et al.*, 2007a]. Ambas mutaciones eran heredadas.

Familia RP-0025 (tabla 4.5)

El estudio de esta familia se llevó a cabo mediante el microarray que reveló una mutación en homocigosis en el gen *CRB1* (p.Ile1100Thr). No pudo realizarse el estudio familiar ya que se disponía únicamente de la muestra del paciente.

Familia RP-0280 (tabla 4.5)

La familia RP-0280 (Fig. 4.8) presenta una fratría de cuatro hermanos, donde el *probandus* presenta un fenotipo de RP-IP, mientras que su hermano padece la enfermedad de Stargardt (degeneración macular juvenil). En esta familia el estudio inicial fue del gen *ABCA4* donde el hermano presentaba una mutación en homocigosis y el *probandus* una mutación en heterocigosis.

El posterior estudio con el microarray LCA de la paciente con RP-IP detectó una mutación en el gen *CRB1* en heterocigosis (p.Cys948Tyr) que llevó a la secuenciación completa del gen, encontrándose una segunda mutación, p.Trp822ter [Vallespín *et al.*, 2007b] que justificaba el fenotipo de la paciente [Riveiro y Vallespín *et al.*, 2007]. Se vio que ambas mutaciones eran heredadas.

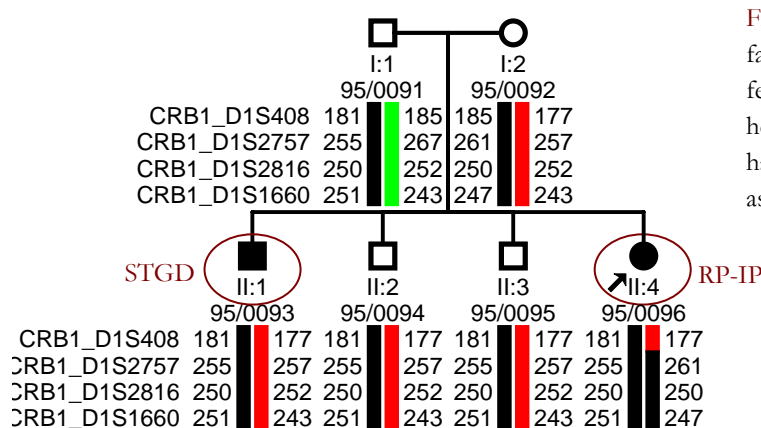


Figura 4.8. Árbol genealógico de la familia RP-0280. La *probandus* presenta un fenotipo de LCA, mientras que su hermano tiene un fenotipo STGD. Los haplotipos marcados en negro van asociados a las mutaciones encontradas.

Familias RP-0091, RP-0457 y RP-0617 (tabla 4.5)

En las familias RP-0091, RP-0457 y RP-0617, el microarray detectó una mutación en el gen *CRB1* (c.478-481insG, p.Asn894Ser y p.Arg1331His, respectivamente), tras la secuenciación del mismo no se encontró un segundo cambio que justificara el fenotipo. En la familia RP-0091 aunque el *probandus* tiene un haplotipo diferente al de su hermano sano no se puede determinar la implicación del gen en la patología, es decir, no se puede descartar o afirmar que sea responsable. En las familias RP-0457 y RP-0617, el análisis de haplotipos no ayudó a su estudio debido a que sólo se disponía del *probandus*.

Familia LCA-0038 (tabla 4.5)

En la familia LCA-0038 (Fig. 4.9) se estudió al paciente índice (V:5) con el microarray de LCA y se encontraron dos mutaciones, una en el gen *CRB1* que había heredado de su madre y otra mutación en el gen *RPGRIP1* heredada de su padre. Se hizo un estudio familiar de haplotipos del gen *CRB1* y se vio que el *probandus* compartía uno de los haplotipos con dos tíos-abuelos (III:6 y III:7) suyos que también eran afectados. Se estudió el gen *CRB1* completo en el *probandus* y se encontró la mutación p.Ile1001Asn [Vallespín *et al.*, 2006b]. Esta mutación la presentaban también ambos tíos-abuelos del *probandus* (III:6 y III:7) por lo que se estudió el gen *CRB1* completo en ambos individuos y se detectó otra nueva mutación en *CRB1*: p.Asp564Thr [Vallespín *et al.*, 2006d].

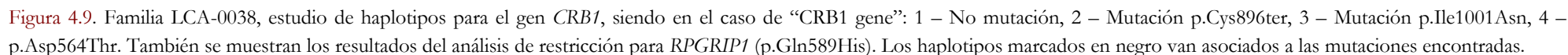
A su vez se estudió otra rama de la familia donde había un varón afecto (III:12) y que era un primo por partida doble de los tíos-abuelos afectados del *probandus*. En este paciente se secuenció *CRB1* y se detectó únicamente la mutación p.Ile1001Asn en heterocigosis.

Respecto a la mutación en *RPGRIP1* (p.Gln589His) se realizó un estudio mediante análisis de restricción en todos los miembros de la familia, observándose que esta mutación no cosegregaba con la enfermedad (Fig. 4.9).

Las mutaciones detectadas en esta familia se detallan en la tabla 4.7.

CRB1_D1S408
CRB1_D1S2757
CRB1_D1S2816
CRB1 gene
CRB1_D1S1660

RPGRIP1 p.Gln589His



Familia LCA-0012 (tabla 4.6)

En la familia LCA-0012 se detectó la mutación p.Ile205Thr en el gen *CRB1*, tras la secuenciación completa del gen no se encontró ningún otro cambio que confirmara la implicación del gen *CRB1* en el fenotipo de la familia. El estudio de haplotipos, en cambio, apunta al gen *CRB1* como responsable de la patología.

En esta familia se detectó también la mutación p.Pro701Ser en el gen *GUCY2D* que es uno de los cambios considerados como polimorfismos o mutaciones modificadoras del fenotipo. Ambos afectados de la familia compartían este cambio y el mismo haplotipo que a su vez era diferente a lo de su hermana sana (Fig. 4.10).

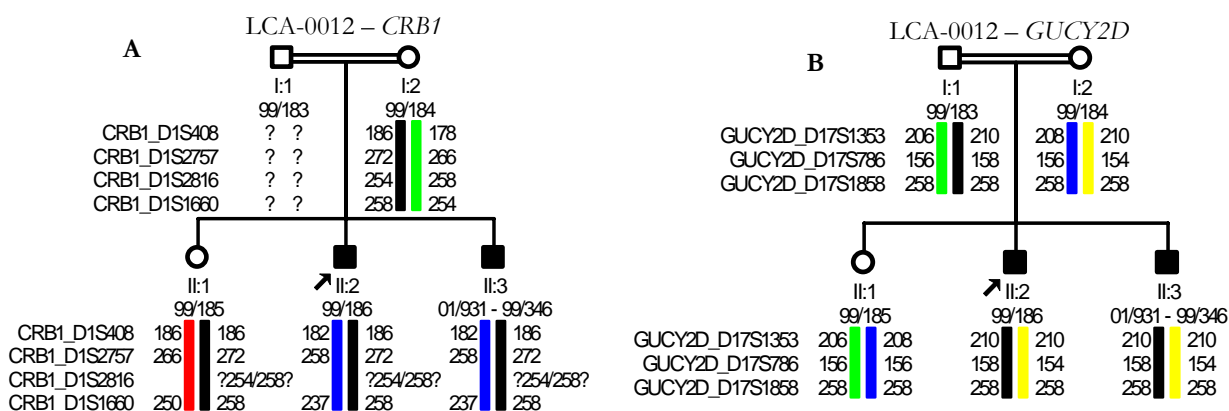


Figura 4.10. Árbol genealógico de la familia LCA-0012; (A) representa el estudio de haplotipos para el gen *CRB1*, y (B) para el gen *GUCY2D*. Los haplotipos marcados en negro van asociados a las mutaciones encontradas.

Familia LCA-0042 (tabla 4.6)

Esta familia presenta las mismas mutaciones que la LCA-0012. Gracias al microarray de genotipado se detectó la mutación p.Ile205Thr en *CRB1* en heterocigosis y tras la secuenciación del gen completo no se encontró una segunda mutación.

También se detectó la mutación p.Pro701Ser en el gen *GUCY2D* en heterocigosis, cambio no considerado como mutación patogénica. No ha podido realizarse el análisis familiar ya que se disponía únicamente de muestra del *probandus* (Fig. 4.11).

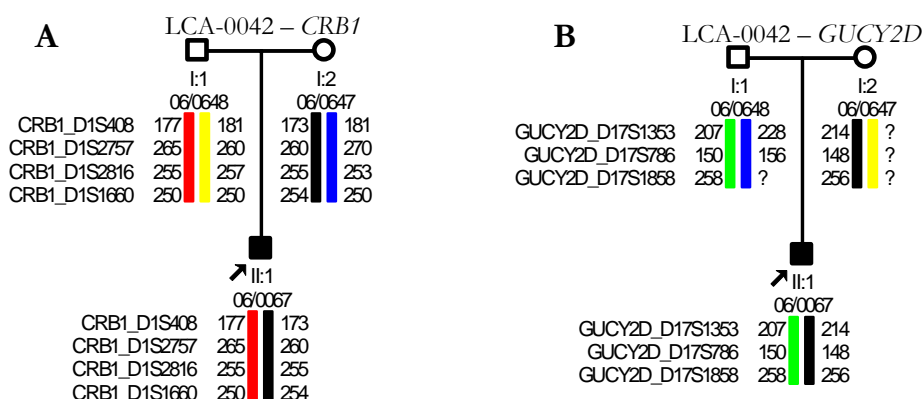


Figura 4.11. Árbol genealógico de la familia LCA-0042; (A) representa el estudio de haplotipos para el gen *CRB1*, y (B) para el gen *GUCY2D*. Los haplotipos marcados en negro van asociados a las mutaciones encontradas.

Familia RP-0310 (tabla 4.6)

En esta familia se detectó la mutación p.Ile205Thr en *CRB1* en heterocigosis y al igual que en las familias LCA-0012 y LCA-0042, tras la secuenciación del gen completo no se encontró una segunda mutación. También se detectó una segunda mutación en otro gen: p.Asp1114Gly en *RPGRIP1* en heterocigosis, cambio considerado polimorfismo o modificador del fenotipo.

El análisis de haplotipos no descartó el gen *CRB1* como responsable del fenotipo y no se detectó en el hermano sano del paciente. También se comprobó que la mutación p.Asp1114Gly en *RPGRIP1* la presentaban ambos hermanos y el análisis de haplotipos no era informativo, ya que siendo afecto sólo uno de los hermanos, la mutación del otro alelos podría ser de novo y no se podría descartar este gen para su estudio (Fig. 4.12).

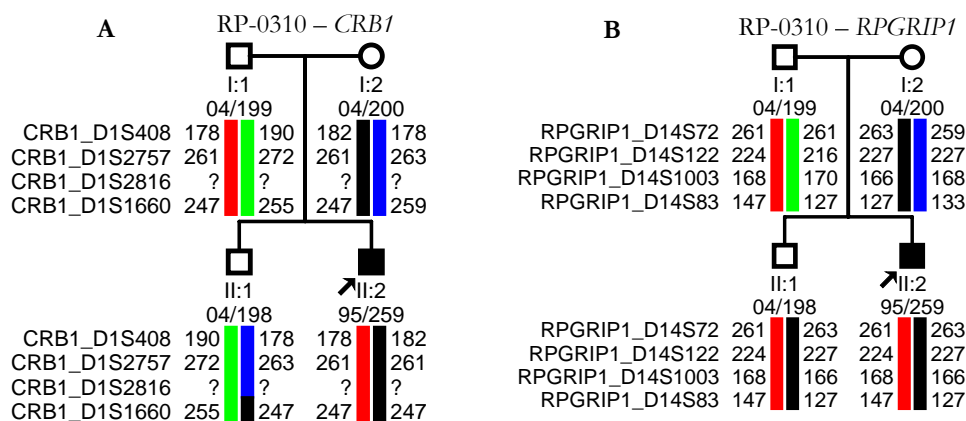


Figura 4.12. Familia RP-0310, análisis familiar de *CRB1* (A) y *RPGRIP1* (B). Los haplotipos marcados en negro van asociados a las mutaciones encontradas.

Familia RP-0137 (tabla 4.6)

En esta familia se encontró una mutación en el gen *CRB1* en heterocigosis (p.Arg905Gln), pero el análisis de haplotipos reveló que la enfermedad no estaba ligada a este gen, por lo que se descartó el estudio de *CRB1*. También el análisis de microarray detectó una mutación en el gen *RPGRIP1* (p.Asp1114Gly), que mediante el estudio familiar con microsatélites se vio que tampoco cosegregaba con la enfermedad (Fig. 4.13).

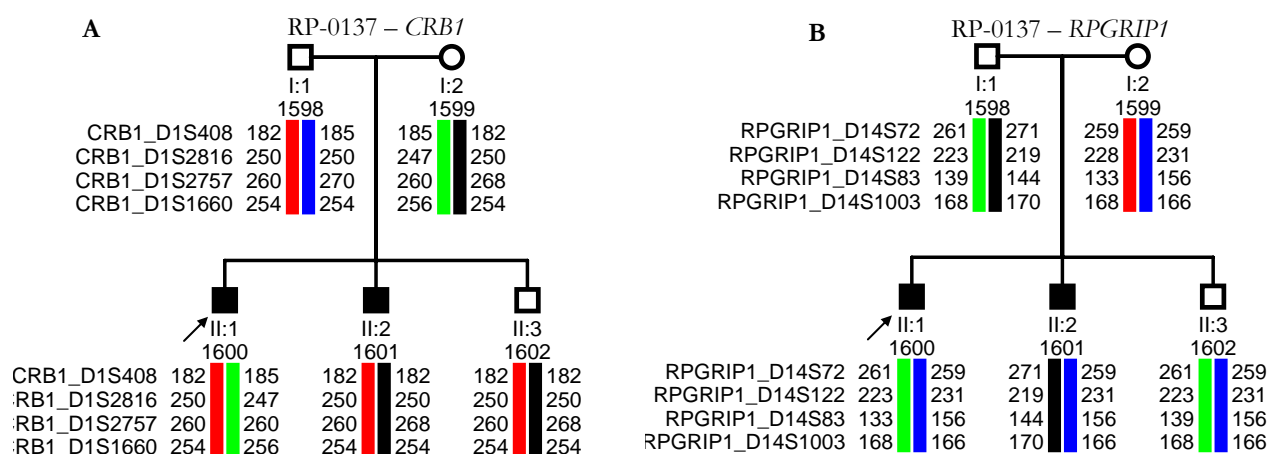


Figura 4.13. Familia RP-0137, análisis de haplotipos para el gen *CRB1* (A) y para el gen *RPGRIP1* (B). Los haplotipos marcados en negro van asociados a las mutaciones encontradas.

Familia RP-1017 (tabla 4.6)

La familia RP-1017 presenta una mutación en el gen *CRB1* en heterocigosis (p.Thr745Met) que fue detectada con el microarray. Tras el estudio completo mediante secuenciación del gen *CRB1* no se encontró otro cambio que justificase el fenotipo.

Además de la mutación en *CRB1* el microarray detectó el cambio p.Asp1114Gly en el gen *RPGRIP1*, considerado polimorfismo o modificador del fenotipo.

El estudio de haplotipos no es informativo ya que al haber sólo un afecto en la familia no permitiría descartar la implicación de ambos genes en la RP-IP de forma trialélica (Fig. 4.14).

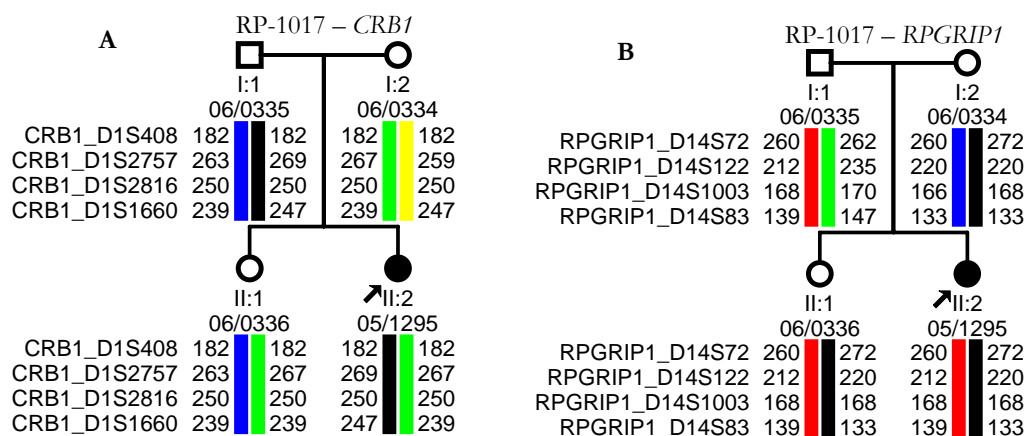


Figura 4.14. Segregación mediante microsatélites de los genes *CRB1* (A) y *RPGRIP1* (B) en la familia RP-1017. Los haplotipos marcados en negro van asociados a las mutaciones encontradas.

Las mutaciones encontradas en este trabajo en el gen *CRB1* se representan en la figura 4.15, siendo las señaladas en color burdeos las mutaciones nuevas encontradas en este estudio.

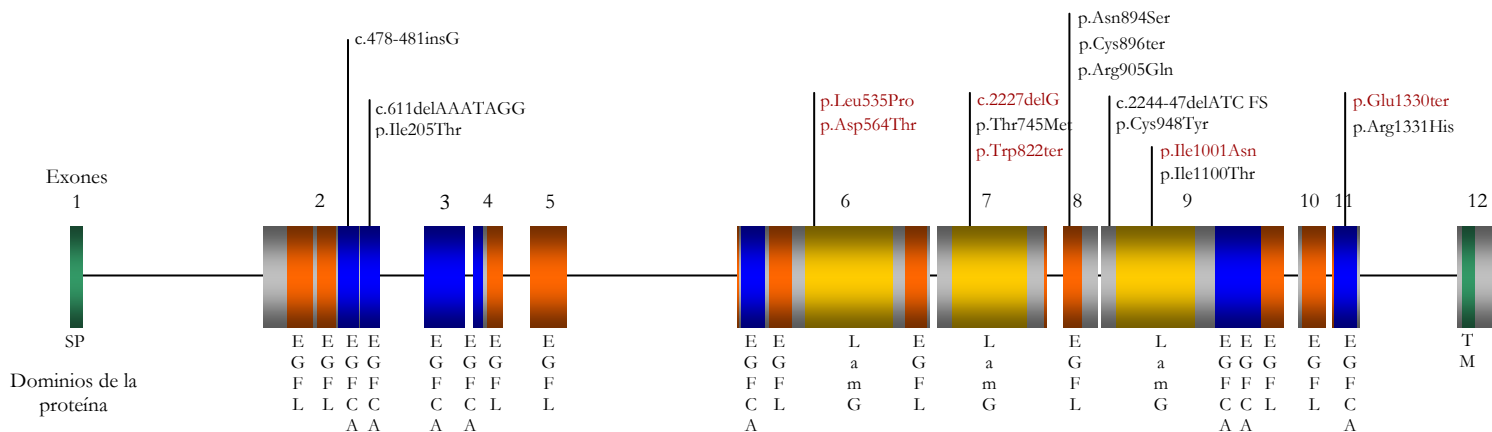


Figura 4.15.

Gen *CRB1* y mutaciones encontradas en este estudio

Mutaciones en negro – Mutaciones ya descritas

Mutaciones en burdeos – Mutaciones nuevas

Dominio de la proteína:

SP – Señal peptídica

TM – Transmembrana

EGFL – *Epidermal growth-factor-like*

EGFLA – *Calcium-binding EGF-like*

4.3.3.2. Estudio del gen *CEP290*

En este gen se realizó el estudio de la mutación p.Cys998ter en todos los pacientes mediante secuenciación automática, en cambio la mutación p.Lys1575ter fue detectada por el microarray. No se continuó con la búsqueda de la segunda mutación debido a que en el momento del diseño de estos experimentos no se contaba con los cebadores y las condiciones para el estudio completo del gen *CEP290*.

Tabla 4.8. Familias LCA y RP-IP con mutaciones en *CEP290*

Familia	ADN	Mutación 1	Mutación 2	Est. familiar
LCA-0006	02/0673	<i>CEP290</i> p.Cys998ter	----	ND
LCA-0043	06/0798	<i>CEP290</i> p.Cys998ter	----	NF
RP-1146	07/0026	<i>CEP290</i> p.Lys1575ter	----	NF

C – Cosegrega con la enfermedad

NC – No cosegrega

ND – No se puede descartar que cosegregue

NF – No hay familia para realizar el estudio

Tabla 4.9. Familias LCA y RP-IP digénicas/trialélicas con *CEP290* implicado

Familia	ADN	Mutación 1	Mutación 2	Mutación 3	Estudio familiar	
					<i>CEP290</i>	2º gen
LCA-0037	05/0454	<i>CEP290</i> p.Cys998ter	<i>CEP290</i> p.Cys998ter	<i>RPGRIP1</i> p.Gln589His	C	NC
LCA-0039	05/0585	<i>CEP290</i> p.Cys998ter	<i>CEP290</i> p.Cys998ter	<i>RPGRIP1</i> p.Thr806Ile	C	ND

C – Cosegrega con la enfermedad

NC – No cosegrega

ND – No se puede descartar que cosegregue

NF – No hay familia para realizar el estudio

Familias LCA-0006 y LCA-0043 (tabla 4.8)

En las familias LCA-0006 y LCA-0043 se ha detectado la mutación p.Cys998ter en el gen *CEP290* en heterocigosis. En la familia LCA-0006 no se pudo descartar que cosegregue ya que hay sólo 1 afecto en la familia. A su vez en la familia LCA-

0043 no se pudo hacer el estudio familiar porque se disponía únicamente de la muestra del *probandus*.

Familia RP-1146 (tabla 4.8)

Esta es la única familia RP-IP donde se detectaron mutaciones en el gen *CEP290* mediante el microarray, el cambio detectado fue p.Lys1575ter en heterocigosis.

Familia LCA-0037 (tabla 4.9)

La familia LCA-0037 presenta la mutación p.Cys998ter en homocigosis, lo que justifica el fenotipo de los pacientes. Además presenta una mutación en el gen *RPGRIP1* (p.Gln589His), no siendo ésta misma una de las consideradas polimórficas o modificadoras del fenotipo sino una mutación patogénica (Fig. 4.16).

La mutación en *CEP290* fue estudiada mediante secuenciación en todos los miembros de la familia, ambas mutaciones son heredadas.

El estudio de *RPGRIP1* se hizo mediante microsatélites, lo que confirmó que la patología no está asociada a este gen ya que los hermanos afectados comparten el mismo haplotipo que su hermana sana.

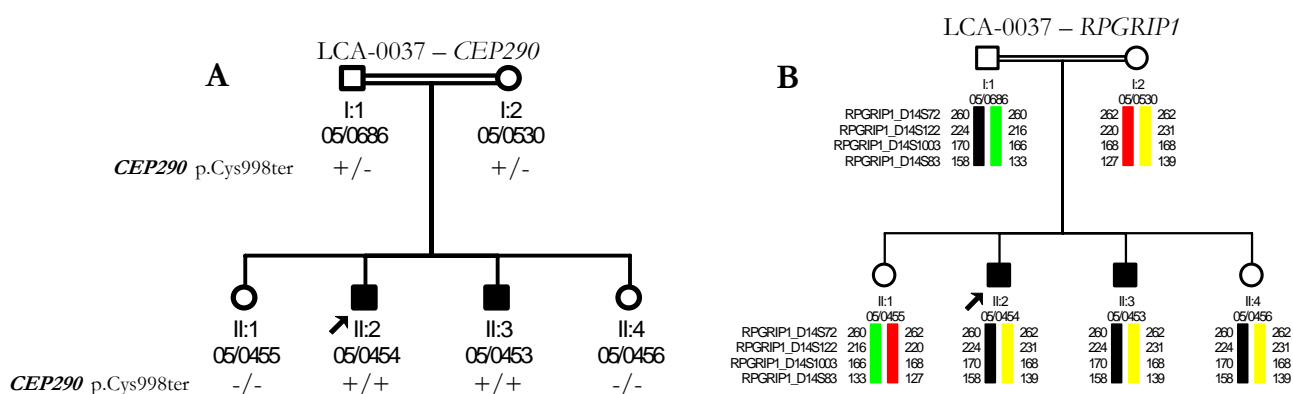


Figura 4.16. (A) Estudio de la mutación p.Cys998ter (*CEP290*) en la familia LCA-0037 y (B) análisis de haplotipos asociados a *RPGRIP1*. Los haplotipos marcados en negro van asociados a las mutaciones encontradas.

LCA-0039 (tabla 4.9)

Al igual que la familia LCA-0037, el *probandus* de esta familia presenta la mutación p.Cys998ter en el gen *CEP290* en homocigosis, lo que justifica el fenotipo. A su vez también presenta una mutación en el gen *RPGRIP1* (p.Thr806Ile) que es una mutación considerada como patogénica.

La mutación en *CEP290* fue estudiada mediante secuenciación en todos los miembros de la familia, mientras que el estudio de *RPGRIP1* se hizo mediante microsatélites (Fig. 4.17).

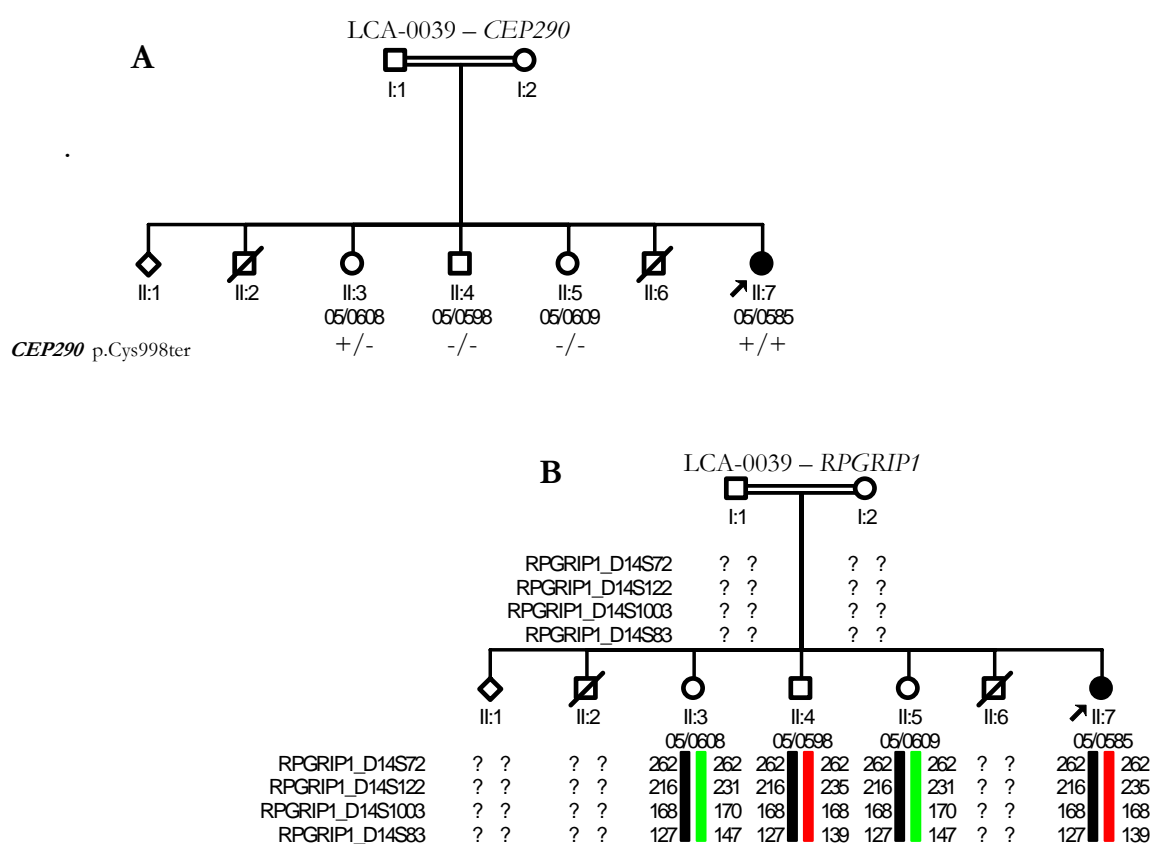


Figura 4.17. (A) Estudio de la mutación p.Cys998ter (*CEP290*) en la familia LCA-0039 y (B) análisis de haplotipos asociados a *RPGRIP1*. Los haplotipos marcados en negro van asociados a las mutaciones encontradas.

4.3.3.3. Estudio del gen *RDH12*

Tabla 4.10. Familias LCA y RP-IP con mutaciones en *RDH12*

Familia	ADN	Mutación 1	Mutación 2	Est. familiar
LCA-0020	04/0573	<i>RDH12</i> p.Leu99Ile	<i>RDH12</i> c.102ins4	C
RP-0184_3	2888	<i>RDH12</i> p.Thr49Met	<i>RDH12</i> p.Thr49Met	C

C – Cosegrega con la enfermedad

NC – No cosegrega

ND – No se puede descartar que cosegregue

NF – No hay familia para realizar el estudio

Familia LCA-0020 (tabla 4.10)

En la familia LCA-0020 se encontraron dos mutaciones en heterocigosis (p.Leu99Ile y c.102ins4) en el gen *RDH12* que justificaban el fenotipo del paciente. El estudio mediante secuenciación confirmó que cada una de las mutaciones procedía de un progenitor.

Familia RP-0184_3 (tabla 4.10)

La familia RP-0184_3, es el subgrupo 3 de la familia RP-0184 que es una familia que consta de un gran número de miembros, que se divide en diferentes ramas y que presenta diferentes fenotipos (Fig. 4.18). En la rama 3 la edad de inicio son los 3 años y no hay sordera asociada a la RP. En este grupo familiar y no en el resto se ha detectado una mutación en homocigosis en gen *RDH12* (p.Thr49Met).

Se confirmó que cada mutación era heredada de un progenitor mediante secuenciación automática, así como que una de las dos hermanas del *probandus* era portadora de una de las mutaciones.

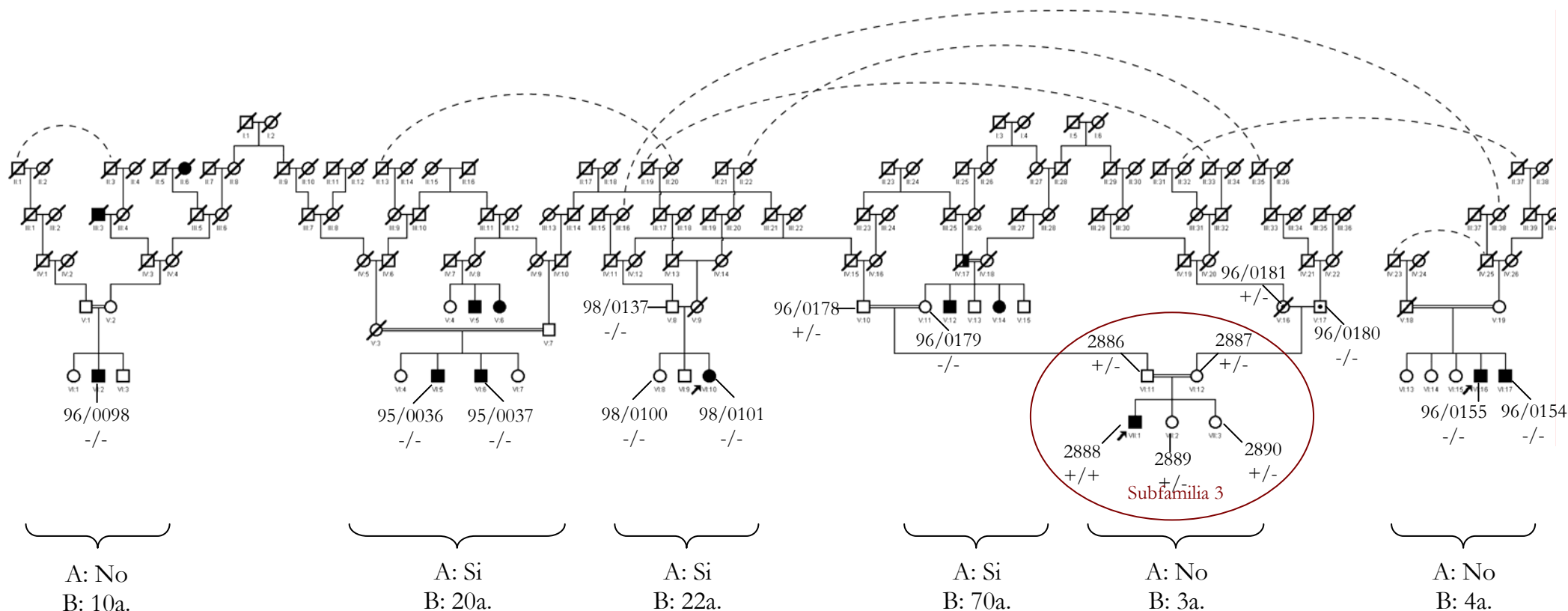


Figura 4.18. Familia RP-0184. Esta tesis doctoral presenta el estudio de la subfamilia 3, donde se ha encontrado una mutación en homocigosis en el gen RDH12. Se ha hecho el estudio de esa mutación en las diferentes ramas familiares para ver si causaba la patología en alguna de ellas pero no ha sido así.

Leyenda:

Mutación *RDH12* p.Thr49Met:

-/- no presenta la mutación;

+/- presenta la mutación en heterocigosis;

++ presenta la mutación en homocigosis.

A: ¿Presenta hipoacusia?

B: Edad inicio síntomas de ceguera

4.3.3.4. Estudio del gen *AIPL1*

Tabla 4.11. Familias LCA y RP-IP con mutaciones en *AIPL1*

Familia	ADN	Mutación 1	Mutación 2	Est. familiar
LCA-0035	05/0240	<i>AIPL1</i> p.Arg38fs	----	C
RP-0995	05/1058	<i>AIPL1</i> p.Arg38fs	----	NF
RP-1021	05/1330	<i>AIPL1</i> p.Arg38fs	----	ND
RP-0029	2241	<i>AIPL1</i> p.Tyr134Phe	----	NF
RP-0082	2318	<i>AIPL1</i> p.Tyr134Phe	----	ND
RP-0882	04/0690	<i>AIPL1</i> p.Tyr134Phe	----	NF
RP-0978	05/0730	<i>AIPL1</i> p.Tyr134Phe	----	NF
RP-1107	06/1004	<i>AIPL1</i> p.Val96Ile	----	NF

C – Cosegrega con la enfermedad

NC – No cosegrega

ND – No se puede descartar que cosegregue

NF – No hay familia para realizar el estudio

Familia LCA-0035 (tabla 4.11)

Tras la detección de la mutación p.Arg38fs en el gen *AIPL1* se secuenció el gen *AIPL1* completo y no se encontró un segundo cambio que justificase el fenotipo. En el análisis de haplotipos se observó que únicamente el *probandus* de la familia presentaba un haplotipo diferente de sus 4 hermanos. Pero este resultado no descarta que sea *AIPL1* el responsable de la LCA en esta familia ya que hay únicamente un afecto.

Familias RP-0995 y RP-1021 (tabla 4.11)

Tras la detección de la mutación p.Arg38fs en el gen *AIPL1* se secuenció en ambas familias el gen *AIPL1* completo y no se encontró un segundo cambio que justificase el fenotipo.

En la familia RP-0995, el análisis de haplotipos no pudo aportar información debido a que se disponía únicamente de muestra del afecto.

En el caso de la RP-1021 el *probandus* tiene un haplotipo diferente de su hermano sano, por lo tanto no se podría descartar que la mutación p.Arg38fs en el gen *AIPL1* fuese la responsable de la RP-IP en esta familia.

Familias RP-0029, RP-0082, RP-0882 y RP-0978 (tabla 4.11)

Este grupo de familias presentan la mutación frecuente de *AIPL1* (p.Tyr134Phe). Tras el análisis estadístico de las frecuencias alélicas, se ha considerado como un polimorfismo o un cambio con efecto modificador del fenotipo.

En tres de ellas (RP-0029, RP-0882 y RP-0978) hay un sólo hijo (el afecto), por lo que el análisis de haplotipos no es informativo para saber si esta mutación cosegrega con la enfermedad. En la familia RP-0082 el haplotipo del hermano sano es diferente del *probandus*, pero lo que no se puede descartar que la enfermedad esté efectivamente ligada a ese gen.

Familia RP-1107 (tabla 4.11)

Tras la detección de la mutación p.Val96Ile en el gen *AIPL1* se secuenció completo y no se encontró un segundo cambio que justificase el fenotipo. No se realizó análisis de haplotipos debido a que se disponía únicamente de la muestra del afecto.

4.3.3.5. Estudio del gen *CRX*

Tabla 4.12. Familias RP-IP con mutaciones en *CRX*

Familia	ADN	Mutación 1	Mutación 2	Est. familiar
RP-0632	00/1109	<i>CRX</i> p.Tyr142Cys	----	NF
RP-0862	04/1169	<i>CRX</i> p.Val66Ile	----	NF

C – Cosegrega con la enfermedad

NC – No cosegrega

ND – No se puede descartar que cosegregue

NF – No hay familia para realizar el estudio

Tabla 4.13. Familias LCA y RP-IP digénicas/trialélicas con *CRX* implicado

Familia	ADN	Mutación 1	Mutación 2	Estudio familiar	
				<i>CRX</i>	2º gen
RP-0977	05/0967	<i>CRX</i> p.Tyr142Cys	<i>RPGRIPI</i> p.Asp1114Gly	ND	ND

C – Cosegrega con la enfermedad

NC – No cosegrega

ND – No se puede descartar que cosegregue

NF – No hay familia para realizar el estudio

Familias RP-0632 y RP-0862 (tabla 4.12)

Tras la detección de las mutaciones p.Tyr142Cys y p.Val66Ile en cada uno de los casos, se realizó el estudio mediante secuenciación automática del gen *CRX* completo y en ninguna de ellas se encontró la segunda mutación que justificase el genotipo.

En la familia RP-0632 se disponía únicamente de la muestra del *probandus*, por lo que no se pudo hacer un análisis familiar. En cambio, en la familia RP-0862 se realizó el estudio familiar para confirmar que la mutación no fuese de novo, se vio que uno de los hermanos de la paciente presentaba también la mutación (Fig. 4.19).

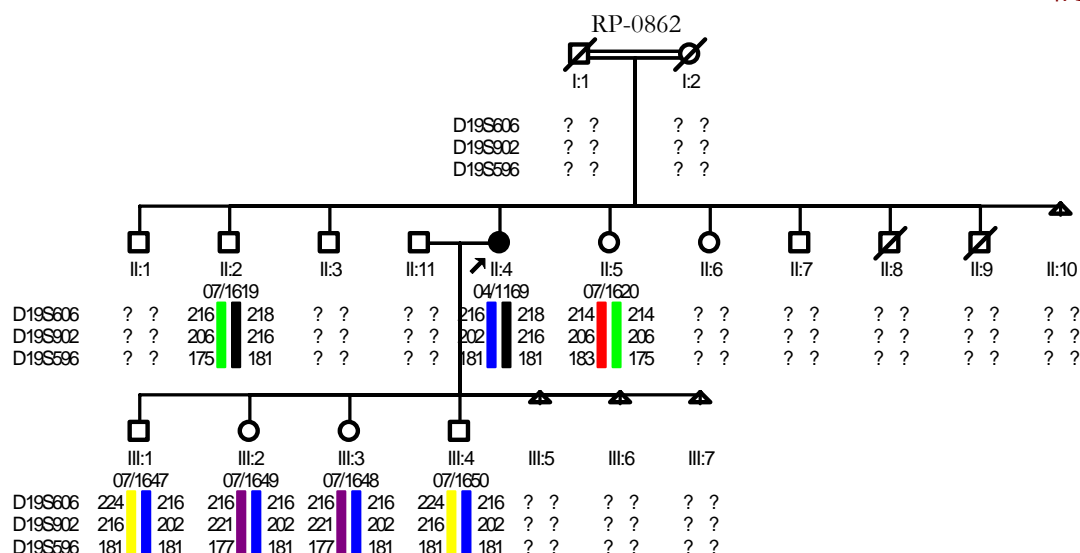


Figura 4.19. Árbol genealógico de la familia RP-0862. Análisis de haplotipos asociados a CRX. Los haplotipos marcados en negro van asociados a las mutaciones encontradas.

Familia RP-0977 (tabla 4.13)

Tras la detección de la mutación p.Tyr142Cys, se realizó el estudio mediante secuenciación automática del gen *CRX* completo y no se encontró la segunda mutación que justificase el fenotipo. Esta familia consanguínea presentaba también uno de los cambios considerados polimórficos o modificadores del fenotipo (*RPGRIP1* p.Asp1114Gly). El análisis de haplotipos no permitió descartar ninguno de los genes, ya que la familia contaba sólo con un afecto. Para descartar que la mutación en *CRX* fuese *de novo* se pidió muestra de la familia del padre y se observó que la mutación era heredada (Fig. 4.20).

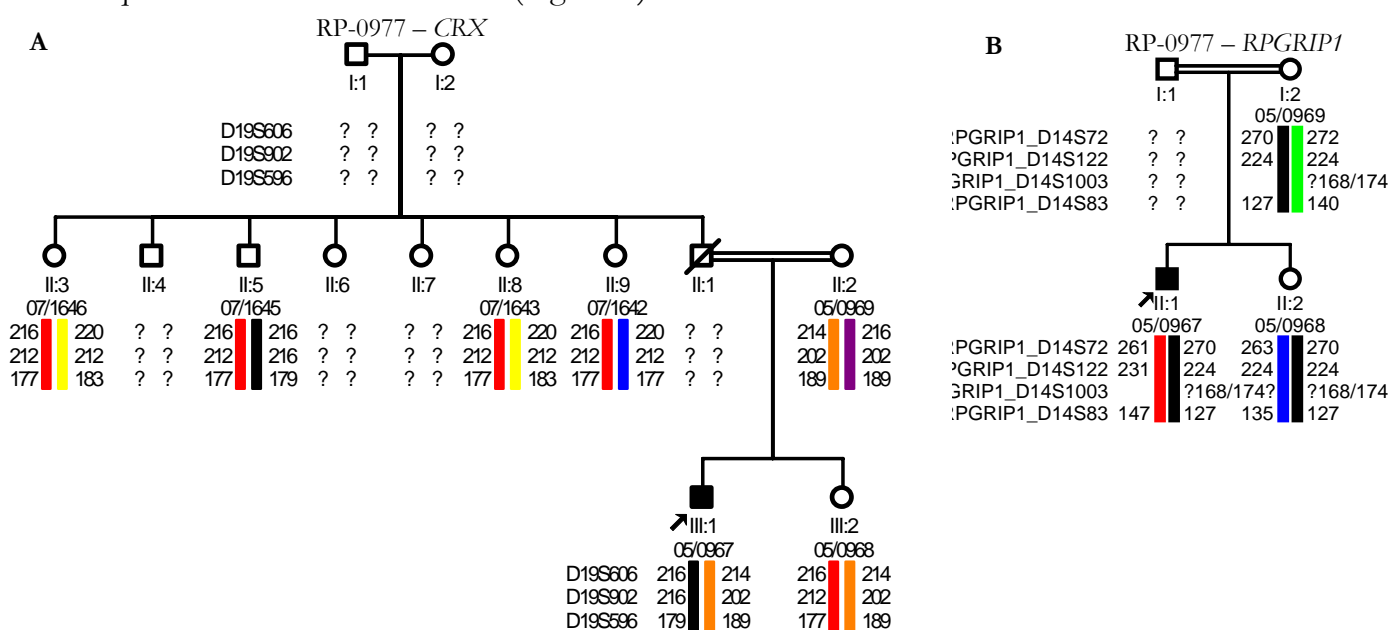


Figura 4.20. Árbol de la familia RP-0977, estudio de microsatélites para el gen *CRX* (A) y el gen *RPGRIP1* (B). Los haplotipos marcados en negro van asociados a las mutaciones encontradas.

4.3.3.6. Estudio del gen *RPGRIP1*

El gen *RPGRIP1* fue estudiado únicamente con el microarray y los microsatélites para el análisis familiar, debido a que en el momento del diseño de estos experimentos no se contaba con los cebadores y las condiciones para el estudio completo del gen.

Tabla 4.14. Familias LCA y RP-IP con mutaciones en *RPGRIP1*

Familia	ADN	Mutación 1	Mutación 2	Est. familiar
LCA-0002	03/1147	<i>RPGRIP1</i> p.Asp1114Gly	----	ND
LCA-0034	05/0076	<i>RPGRIP1</i> p.Asp1114Gly	----	NF
LCA-0029	04/1283	<i>RPGRIP1</i> p.Arg812Gln	----	NF
RP-0061	1039	<i>RPGRIP1</i> p.Asp1114Gly	----	C
RP-0544	00/0786	<i>RPGRIP1</i> p.Asp1114Gly	----	NC
RP-0621	00/0859	<i>RPGRIP1</i> p.Asp1114Gly	----	NF
RP-1003	05/1041	<i>RPGRIP1</i> p.Asp1114Gly	----	NF
RP-0726	02/0430	<i>RPGRIP1</i> p.Ile1120Leu	----	NF
RP-0841	04/0119	<i>RPGRIP1</i> p.Thr806Ile	----	ND

C – Cosegrega con la enfermedad

NC – No cosegrega

ND – No se puede descartar que cosegregue

NF – No hay familia para realizar el estudio

Tabla 4.15. Familias LCA y RP-IP digénicas/trialélicas con *RPGRIP1* implicado

Familia	ADN	Mutación 1	Mutación 2	Mutación 3	Referencia*
LCA-0038_1	04/1357	<i>CRB1</i> p.Cys896ter	<i>CRB1</i> p.Ile1001Asn ^N	<i>RPGRIP1</i> p.Gln589His	Tabla 4.6
LCA-0038_2	03/0945	<i>CRB1</i> p.Ile1001Asn ^N	<i>CRB1</i> p.Asp564Thr ^N	<i>RPGRIP1</i> p.Gln589His	Tabla 4.6
RP-0137	1601	<i>CRB1</i> p.Arg905Gln	<i>RPGRIP1</i> p.Asp1114Gly	----	Tabla 4.6
RP-0310	95/0259	<i>CRB1</i> p.Ile205Thr	<i>RPGRIP1</i> p.Asp1114Gly	----	Tabla 4.6

RP-1017	05/1295	<i>CRB1</i> p.Thr745Met	<i>RPGRIP1</i> p.Asp1114Gly	-----	Tabla 4.6
LCA-0037	05/0454	<i>CEP290</i> p.Cys998ter	<i>CEP290</i> p.Cys998ter	<i>RPGRIP1</i> p.Gln589His	Tabla 4.9
LCA-0039	05/0585	<i>CEP290</i> p.Cys998ter	<i>CEP290</i> p.Cys998ter	<i>RPGRIP1</i> p.Thr806Ile	Tabla 4.9
RP-0977	05/0967	<i>CRX</i> p.Tyr142Cys	<i>RPGRIP1</i> p.Asp1114Gly	-----	Tabla 4.13

* – Referencia de la tabla que describe esa familia

C – Cosegrega con la enfermedad

NC – No cosegrega

ND – No se puede descartar que cosegregue

NF – No hay familia para realizar el estudio

Familias LCA-0002 y LCA-0034 (tabla 4.14)

Ambas familias presentan un cambio en heterocigosis en el gen *RPGRIP1*, este cambio (p.Asp1114Gly) es uno de los considerados polimórficos o modificadores del fenotipo.

El análisis de haplotipos no permitió descartar este gen en la familia LCA-0002, no se puede confirmar ya que hay sólo un afecto, mientras que en el caso de la LCA-0034 no se realizó el estudio debido a que no se disponía de muestra de los familiares.

Familia LCA-0029 (tabla 4.14)

La familia LCA-0029 presenta la mutación p.Arg812Gln en el gen *RPGRIP1*. El análisis familiar no pudo revelar nada debido a que sólo se disponía de la muestra del afecto.

Familias RP-0061, RP-0544, RP-0621 y RP-1003 (tabla 4.14)

Presentan el cambio p.Asp1114Gly, que es uno de los considerados polimórficos o modificadores del fenotipo.

En las familias RP-0061 y RP-0544 se llevó a cabo el estudio familiar, viéndose que en el caso de la RP-0061 los haplotipos de los afectados eran iguales entre sí y diferentes a los de los hermanos sanos, por lo que este gen no cosegregaba en el caso de esta familia. En cambio, en la RP-0544 no cosegregaba con la enfermedad.

En lo casos RP-0621 y RP-1003 no se realizó el análisis ya que se disponía sólo de la muestra del *probandus* en el primer caso y el segundo es hijo único.

Familias RP-0726 y RP-0841 (tabla 4.14)

Las familias RP-0726 y RP-0841 presentan las mutaciones p.Ile1120Leu y p.Thr806Ile, respectivamente en el gen *RPGRIP1*.

El análisis de haplotipos se pudo realizar exclusivamente en la familia RP-0841 debido al número de muestras, y se observó que no se podía descartar el gen *RPGRIP1* como responsable del fenotipo en la familia.

4.3.3.7. Estudio del gen *GUCY2D*

El gen *GUCY2D* se estudió únicamente con el microarray LCA y los microsatélites para el análisis familiar, debido a que en el momento del diseño de estos experimentos no se contaba con los cebadores y las condiciones para el estudio completo del gen.

Tabla 4.16. Familias RP-IP con 1 mutación en *GUCY2D*

Familia	ADN	Mutación 1	Mutación 2	Est. familiar
RP-0050	1617	<i>GUCY2D</i> p.Leu41Phe	----	NF
RP-0591	00/0311	<i>GUCY2D</i> p.Pro701Ser	----	ND
RP-0933	05/0047	<i>GUCY2D</i> p.Pro701Ser	----	ND

C – Cosegrega con la enfermedad

NC – No cosegrega

ND – No se puede descartar que cosegregue

NF – No hay familia para realizar el estudio

Tabla 4.17. Familias LCA y RP-IP digénicas/trialélicas con *GUCY2D* implicado

Familia	ADN	Mutación 1	Mutación 2	Referencia*
LCA-0012	99/0186	<i>CRB1</i> p.Ile205Thr	<i>GUCY2D</i> p.Pro701Ser	Tabla 4.6
LCA-0042	06/0067	<i>CRB1</i> p.Ile205Thr	<i>GUCY2D</i> p.Pro701Ser	Tabla 4.6

* – Referencia de la tabla que describe esa familia

Familia RP-0050 (tabla 4.16)

La familia RP-0050 presenta la mutación p.Leu41Phe en el gen *GUCY2D*, no se continuó con la búsqueda de la segunda mutación debido a que en el momento del diseño de estos experimentos no se contaba con los cebadores y las condiciones para el estudio completo de este gen. Además el análisis de haplotipos no se pudo realizar debido a que se disponía únicamente de la muestra del *probandus*.

Familias RP-0591 y RP-0933 (tabla 4.16)

Ambas familias presentan el cambio p.Pro701Ser, que es uno de los considerados polimórficos o modificadores del fenotipo.

En ambos casos el análisis de haplotipos no descartó este gen como responsable de la enfermedad.

4.4. Análisis de resultados

4.4.1. Familias caracterizadas en LCA y RP-IP

Tras el estudio completo de las familias, se han reanalizado los resultados obteniéndose la gráfica mostrada en la figura 4.21.

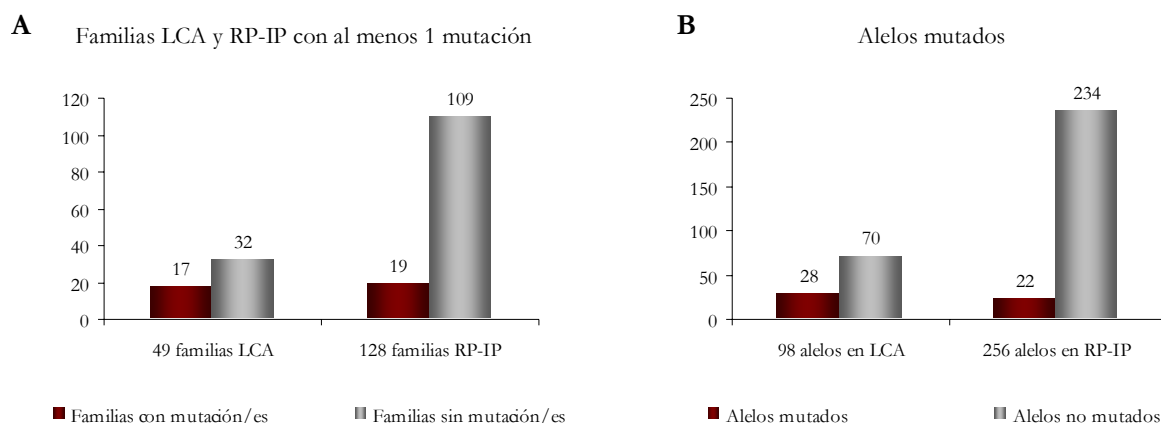


Figura 4.21. Resultados obtenidos tras el análisis completo de las familias. **(A)** Porcentaje de familias con al menos una mutación en los grupos LCA y RP-IP. **(B)** Porcentaje de alelos mutados en familias LCA y RP-IP.

Sin tener en cuenta los cambios considerados como polimórficos o modificadores del fenotipo, se han encontrado cambios en 17 familias con fenotipo LCA y 19 con fenotipo RP-IP. De las 19 familias LCA, en 11 de ellas se han encontrado ambas mutaciones responsables del fenotipo, mientras que en el caso de las RP-IP han sido 3 (Fig. 4.22).

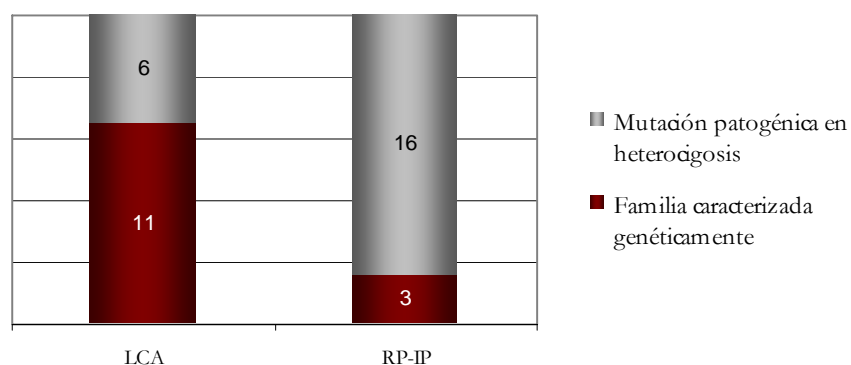


Figura 4.22. Número total de familias caracterizadas en LCA y RP-IP. Las familias marcadas en burdeos son la que han sido caracterizadas genéticamente, es decir se han encontrado las dos mutaciones que justifican el fenotipo. Las familias marcadas en gris son las que presentan una mutación patológica pero no se ha encontrado la segunda que justifique el fenotipo.

4.4.2. Familias caracterizadas según consanguinidad/endogamia

En las familias afectas de LCA donde se ha encontrado al menos una mutación responsable del fenotipo, un 15% de las mismas presentaban consanguinidad. Si, además se tiene en cuenta la endogamia el porcentaje aumenta hasta un 22,22% (Fig. 4.23, A).

En el caso de las familias RP-IP, un 21,05% de las que presentan mutación son consanguíneas y un 42,11% si se tiene en cuenta también la endogamia (Fig. 4.23, B).

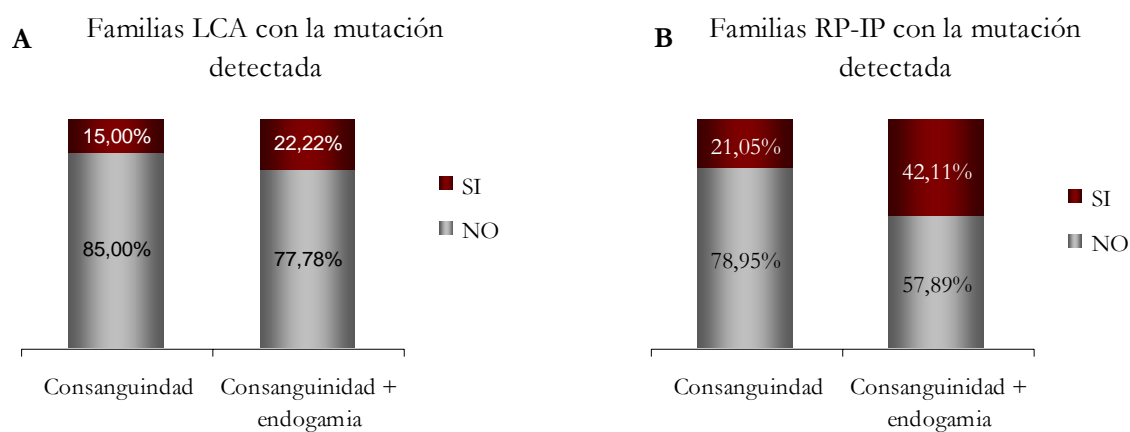


Figura 4.23. Relación de familias consanguíneas y endogámicas en base al fenotipo.

4.4.3. Espectro de genes responsables de LCA y RP-IP en España

Tanto en pacientes con LCA como con RP-IP el gen que tiene una mayor tasa de mutación en nuestra población es *CRB1* (Fig. 4.24, A).

En pacientes con LCA, tras *CRB1*, el gen más frecuente es *CEP290*. En pacientes RP-IP, son *AIPL1* y *CRX* (Fig. 4.24, B).

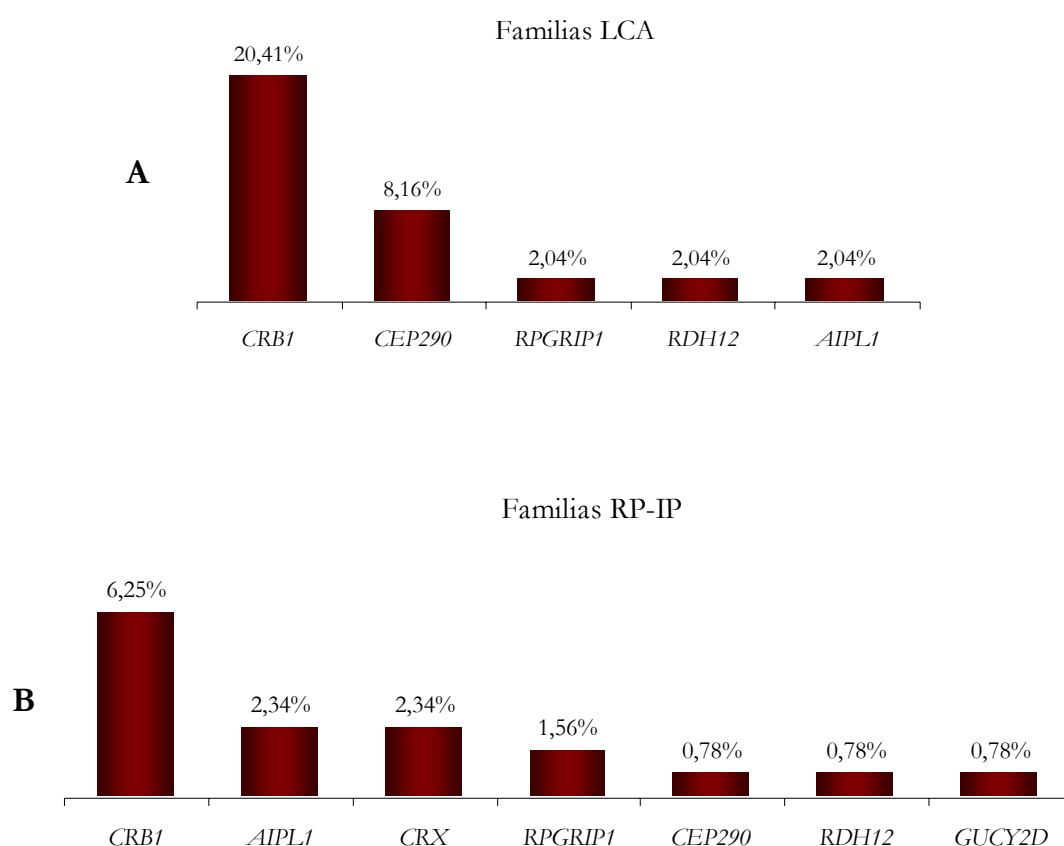


Figura 4.24. Representación de genes mutados en pacientes con LCA (**A**) y RP-IP (**B**), expresado en porcentaje respecto al 100% del total de familias estudiadas. No se han contabilizado los tres cambios excluidos del estudio por no considerarse patogénicos en sí mismos (*RPGRIP1* p.Asp1114Gly, *GUCY2D* p.Pro701Ser y *AIPL1* p.Tyr134Phe).

4.4.4. Frecuencia de LCA en población española

Se ha calculado la frecuencia de LCA en población española en base a los resultados obtenidos en este estudio.

$$\frac{\text{nº total de afectos de LCA}}{\text{nº total de afectos de RP}} = \frac{\quad}{1701} = 0,036$$

El 3,6% de nuestros pacientes con RP son LCA

Si la prevalencia de la RP en población es de 0,33:1000 (1:3000) y el 3,6% de los casos son LCA, la prevalencia de la LCA en España será de 1,2:100000.

Prevalencia de LCA en España = 1,2:100000

4.4.5. Frecuencia de *CRB1* en población española

A su vez se ha calculado la frecuencia del gen *CRB1* en población española.

$$\frac{\text{nº total de alelos mutados en CRB1 en afectos de LCA}}{\text{nº total de alelos LCA}} = \frac{20}{98} = 0,204$$

El 20,4% de nuestras familias con LCA presentan mutaciones en *CRB1*.

Siendo la prevalencia de LCA en población española 1,2 de cada 100000 nacidos vivos y el 20,4% de los pacientes LCA presentan mutaciones en *CRB1*, la frecuencia (q^2) es 1:2448000, siendo $q=1565$.

Por lo tanto, al tratarse de una *enfermedad rara* la frecuencia de heterocigotos es $2q$, por lo que 1 de cada 3130 (1565×2) españoles presenta una mutación en *CRB1*.

1:3130

4.5. Distribución geográfica

4.5.1. Familias LCA

En el la figura 4.25 se representan todas las familias con fenotipo LCA estudiadas en esta tesis doctoral. Se ha representado la población de nacimiento de los cuatro abuelos del *probandus* de cada familia. Se puede observar que la distribución de las familias es homogénea por toda España.

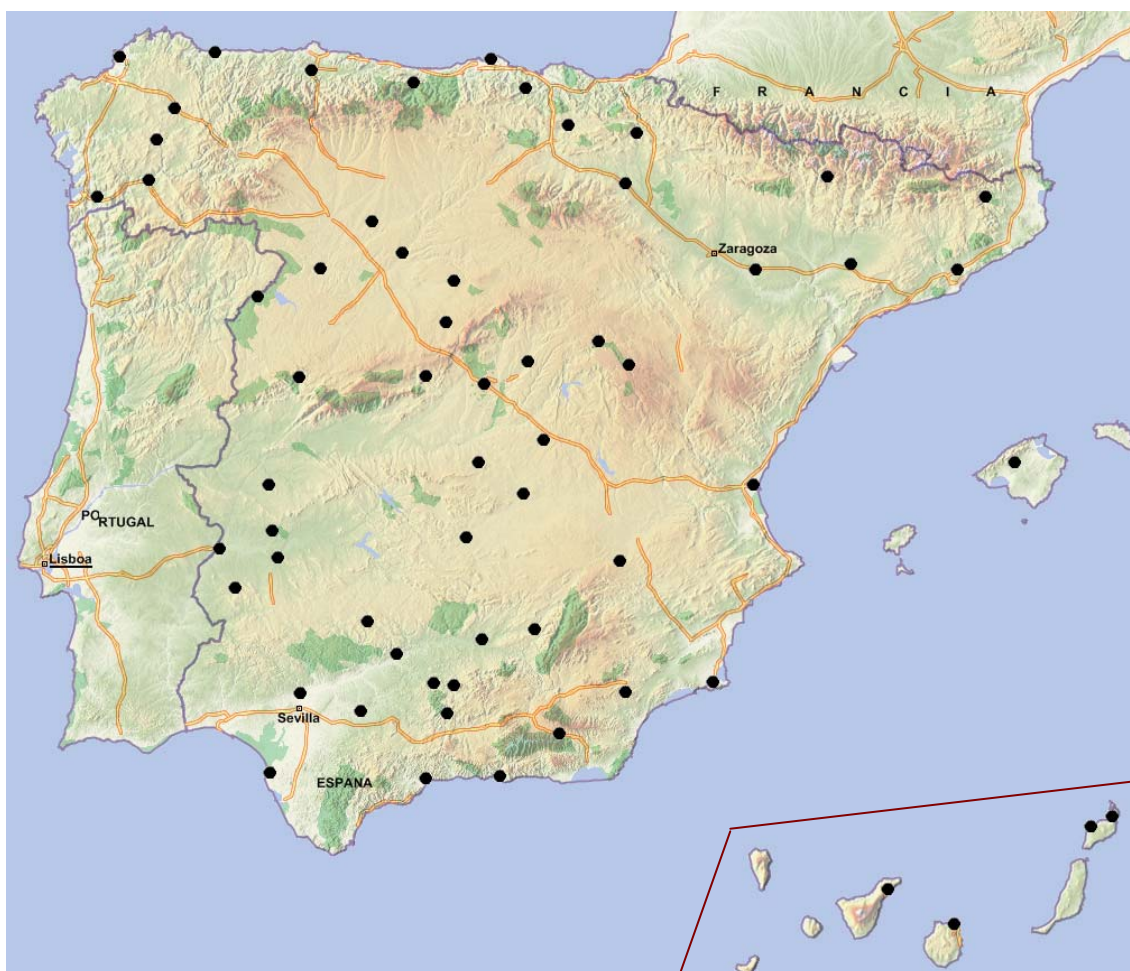


Figura 4.25. Mapa de España (a excepción de Ceuta y Melilla, donde no hay familias con LCA) con la distribución geográfica de todas las familias analizadas en este manuscrito con fenotipo LCA. Se ha representado la población de nacimiento de los cuatro abuelos del *probandus*.

4.5.2. Familias RP-IP

La figura 4.26 representa la distribución de todas las familias de RP-IP presentadas en este trabajo, estando representadas las poblaciones de nacimiento de los cuatro abuelos del *probandus* de cada familia. Las familias se reparten de forma homogénea por toda España a excepción de la Comunidad Valenciana, Navarra, Aragón y parte de Cataluña.

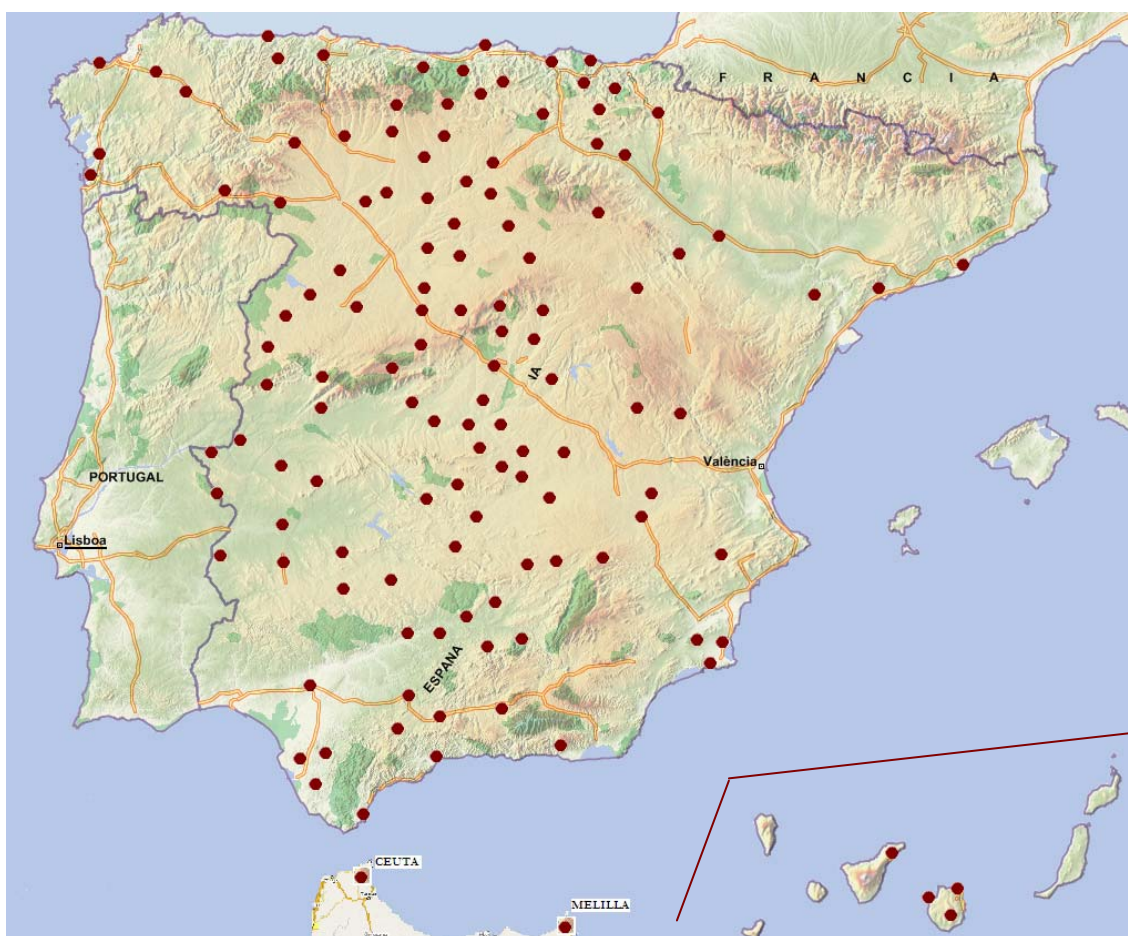


Figura 4.26. Mapa de España con la distribución geográfica de todas las familias analizadas en este manuscrito con fenotipo RP-IP. Se representa la población de nacimiento de los cuatro abuelos del *probandus*.

4.5.3. Familias con mutaciones en *CRB1*

La figura 4.27 representa la localización geográfica de las familias estudiadas en este trabajo que presentan mutaciones en el gen *CRB1*. Se observa que no se reparte de forma homogénea, revelando una densidad más alta en la zona de Castilla y León.

Mediante un análisis estadístico se ha confirmado que la densidad de pacientes con mutaciones en el gen *CRB1* es más alta en Castilla y León que en el resto de España.

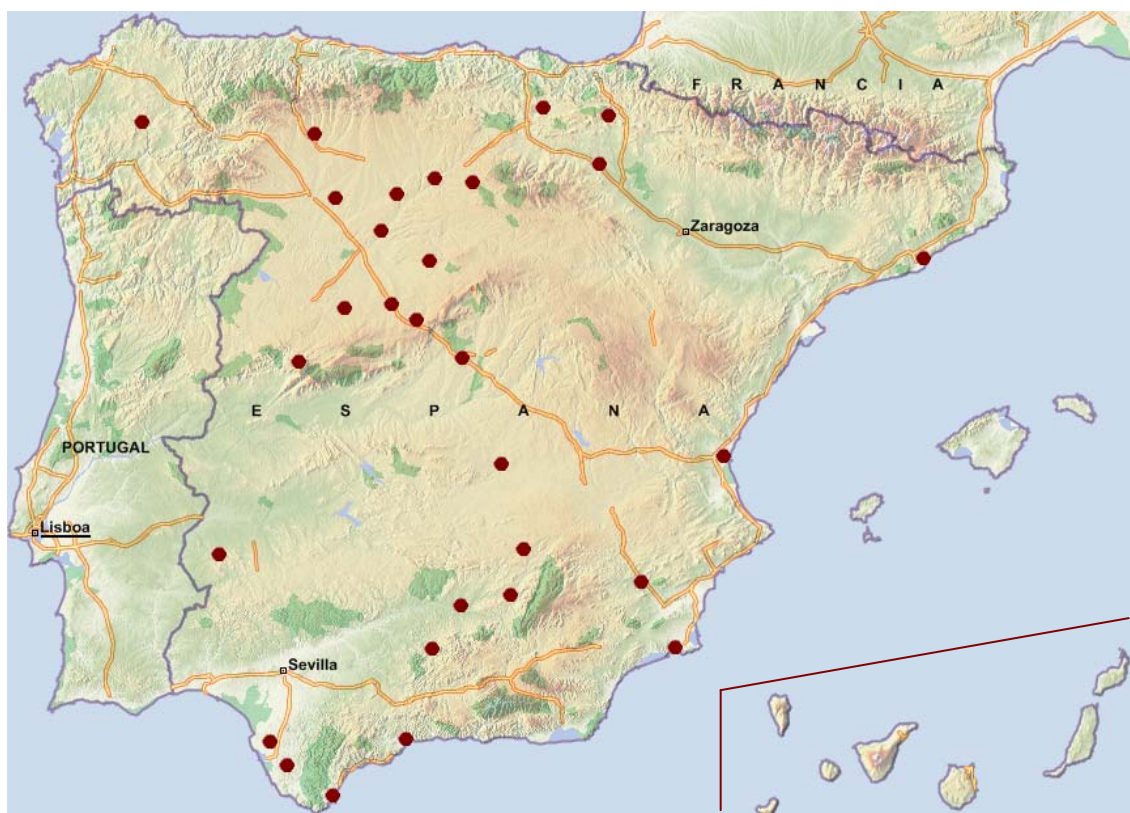


Figura 4.27. Mapa de España (a excepción de Ceuta y Melilla, donde no hay familias con esta mutación) con la distribución geográfica de las familias que presentan la mutación p.Cys948Tyr en el gen *CRB1*. El origen geográfico que se representa en este mapa, es el de los dos abuelos del *probandus* cuyos haplotipos van asociados a la mutación. En el caso donde no se conoce la fase del haplotipo, se han representado las poblaciones de nacimiento de los cuatro abuelos. La familia LCA-0028 no aparece representada en el mapa ya que el origen es paterno y los padres de éste individuo son de Argentina.

4.5.4. Cambio p.Asp1114Gly (*RPGRIP1*)

En el mapa de la figura 4.28, se representa la distribución geográfica del cambio p.Asp1114Gly en el gen *RPGRIP1*. Destacan dos regiones principales donde el cambio está más representado: el noroeste de Castilla y León y Canarias, con 4 y 2 familias, respectivamente.

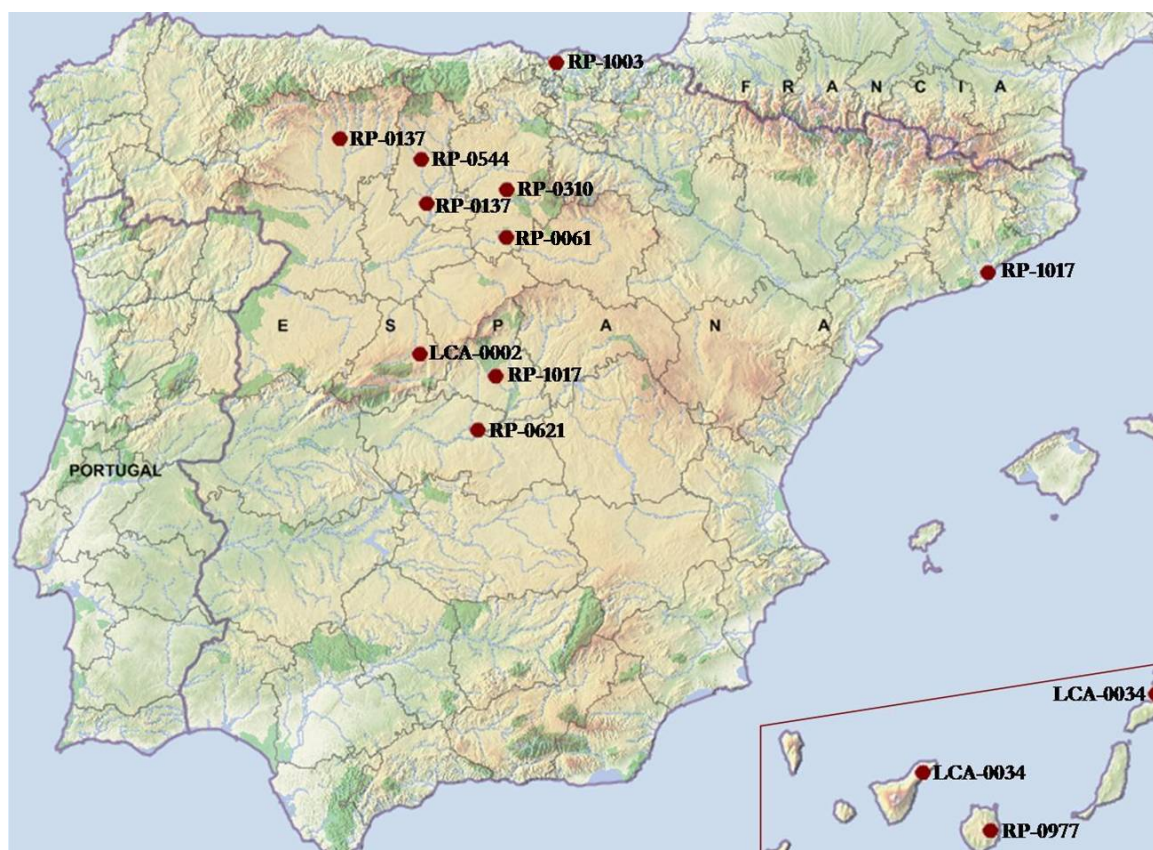


Figura 4.28. Mapa de España (a excepción de Ceuta y Melilla, donde no hay familias con este cambio) con la distribución geográfica de las familias que presentan la variación p.Asp1114Gly en el gen *RPGRIP1*. El origen geográfico que se representa en este mapa, es el de los dos abuelos del *probandus* cuyos haplotipos van asociados a la mutación. En el caso donde no se conoce la fase del haplotipo, se han representado las poblaciones de nacimiento de los cuatro abuelos.

	RP-1003	RP-0310	RP-0544	RP-0137	RP-0061	Distancia a RPGRIP1
D14S72	258/268	263	270	272	272	0,385 cM
D14S122	216/228	227	194	220	220	0,378 cM
c.574A>G	G	G	G	G	G	Intragénico
c.907-17delTAA	A	A	T	T	T/A	Intragénico
c.3097G>C	G	G	G	G	G/C	Intragénico
Gen <i>RPGRIP1</i>	p.Asp1114Gly	p.Asp1114Gly	p.Asp1114Gly	p.Asp1114Gly	p.Asp1114Gly	
D14S1003	168/172	166	170	170	168	0,297 cM
D14S283	127/145	127	127	144	135	0,868 cM

	LCA-0002	RP-1017	RP-0621	RP-0977	LCA-0034	Distancia a RPGRIP1
D14S72	261	272	261	270	261/272	0,385 cM
D14S122	220	220	220	224	216/228	0,378 cM
c.574A>G	A	G	A/G	G	A/G	Intragénico
c.907-17delTAA	T	A	T	T	T/A	Intragénico
c.3097G>C	G	G	G	G	G	Intragénico
Gen <i>RPGRIP1</i>	p.Asp1114Gly	p.Asp1114Gly	p.Asp1114Gly	p.Asp1114Gly	p.Asp1114Gly	
D14S1003	168	168	166/168	168/174	168/172	0,297 cM
D14S283	139	133	139/147	127	127/145	0,868 cM

Figura 4.29. Haplotipos asociados a la mutación p.Asp1114Gly en el gen *RPGRIP1*.

Se observa que el polimorfismo c.3097G>C va asociado a la mutación, siendo una Guanina lo que aparece siempre en esa posición. A su vez, como se observa en la tabla 4.29, algunas familias comparten parte de los haplotipos.

Se ha llevado a cabo un análisis mediante el programa *CLUSTAL W* (1.81) *Multiple Sequence Alignments*, con el siguiente diseño: tras establecer el haplotipo asociado a la mutación, se ha asignado dentro de cada uno de los marcadores una letra a cada uno de los valores obtenidos en ese marcador. Se ha construido un haplotipo mediante letras y se ha comparado en el programa, el cuál alinea los haplotipos y los compara entre sí (Fig. 4.30). Basándose en el principio de máxima parsimonia ha creado un árbol mediante el método NJ (*Neighbor-join*) “Unión de Vecinos” donde agrupa las familias es base a la similitud del haplotipo.

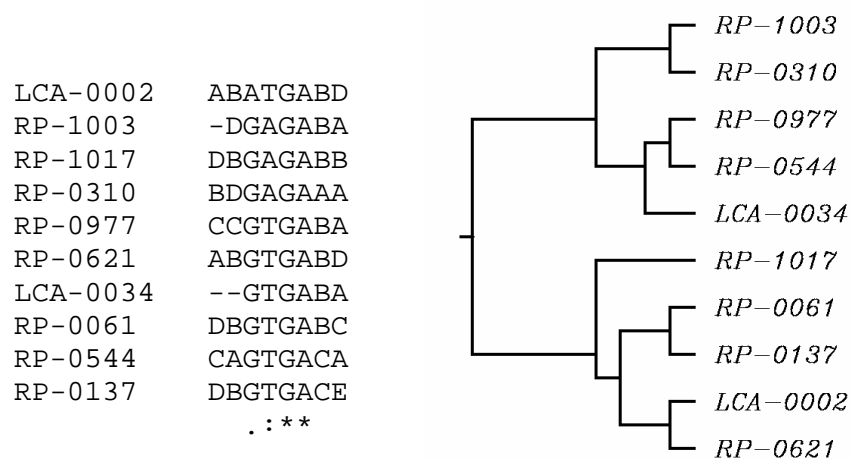


Figura 4.30. Árbol NJ (“Unión de vecinos”) para la mutación p.Asp1114Gly en el gen *RPGRIP1*. “*” indica que esa posición está completamente conservada, “:” indica que esa posición está muy conservada, “.” indica que esa posición está poco conservada.

Como se observa en la figura 4.29, el polimorfismo c.3097G>C va asociado a la mutación en forma de Guanina en todas las familias. Este dato sugiere un origen común del haplotipo. El resto de cambios darán una estimación aproximada de la evolución del haplotipo.

El árbol obtenido (Fig. 4.30), divide a las familias en dos grandes grupos y después cada uno de ellos hace lo propio.

El primer grupo grande tiene como subgrupo la familia RP-1003 y RP-0310, que en el mapa están relativamente próximas, ambos puntos distan 189 Km. El otro subgrupo incluye a las familias LCA-0034, RP-0977 y RP-0544, de las cuales dos de ellas (LCA-0034 y RP-0977) son del archipiélago Canario.

En el otro grupo destaca una familia que tiene el haplotipo menos parecido a las demás, la RP-1017 cuyo origen no se puede establecer con claridad ya que los abuelos de la paciente de los cuales provenía ese haplotipo eran de Madrid y Barcelona. Hay otros dos subgrupos donde por un lado destacan las familias RP-0061 y RP-0137 que pertenecen a poblaciones próximas 143 Km. Por otro lado hay agrupación de las familias LCA-0002 y RP-0621 que comparten el haplotipo completo y como se observa en la figura 4.29 están próximas geográficamente 156 Km.

4.5.5. Mutación p.Cys948Tyr (*CRB1*)

El mapa de la figura 4.31 representa la distribución geográfica de la mutación p.Cys948Tyr en el gen *CRB1*. En el mapa no se observa ninguna agrupación de familias a excepción de LCA-0011 y LCA-0004.

Se han estudiado los haplotipos de las familias mediante microsatélites en *CRB1* para ver si existe un haplotipo común (Fig.4.32). Todas las familias comparten el marcador D1S2816 situado a 0,587cM del gen *CRB1*.



Figura 4.31. Mapa de España (a excepción de Ceuta y Melilla, donde no hay familias con esta mutación) con la distribución geográfica de las familias que presentan la mutación p.Cys948Tyr en el gen *CRB1*. El origen geográfico que se representa en este mapa, es el de los dos abuelos del *probandus* cuyos haplotipos van asociados a la mutación. En el caso donde no se conoce la fase del haplotipo, se han representado las poblaciones de nacimiento de los cuatro abuelos. La familia LCA-0028 no aparece representada en el mapa ya que el origen es paterno y los padres de éste individuo son de Argentina.

	RP-0280	LCA-0004	LCA-0011	LCA-0027	LCA-0028	LCA-0032	Distancia a <i>CRB1</i>
D1S408	181	181	185	181	185	181	3,297 cM
D1S2757	255	267	255	267	267	257	2,499 cM
D1S2816	250	250	250	250	250	250	0,587 cM
Gen <i>CRB1</i>	p.Cys948Tyr	p.Cys948Tyr	p.Cys948Tyr	p.Cys948Tyr	p.Cys948Tyr	p.Cys948Tyr	
D1S1660	251	239	239	239	239	239	1,200 cM

Figura 4.32. Haplotipos asociados a la mutación p.Cys948Tyr en *CRB1*.

Para la mutación frecuente en *CRB1* se ha llevado a cabo el mismo análisis que el realizado en el apartado anterior para la mutación p.Asp1114Gly en el gen *RPGRIP1* (Fig. 4.33).

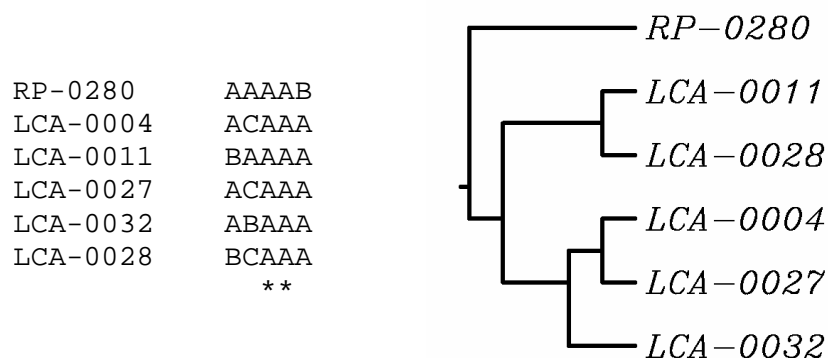


Figura 4.33. Árbol NJ ("Unión de vecinos") para la mutación p.Cys948Tyr en *CRB1*. "*" indica que esa posición está completamente conservada.

La distribución de esta mutación en el mapa de la figura 4.31 muestra que está repartida por toda España.

4.5. Correlación genotipo-fenotipo

4.5.1. Gen *CRB1*

Familia	ED	AV	Error de refracción	Disco óptico	Vasos	Fondo de ojo Descripción	Mácula	PPRPE	ERG (edad)	Movilidad	Biomi- crosco- pía	Mutaciones
LCA-0004	N	ND	+8 +7	Normal	Normal	Normal	Normal	No	Abolido (1a.)	Nistagmo y estrabismo	Signo oculodigital	<i>CRB1</i> p.Cys896ter het <i>CRB1</i> p.Cys948Tyr het
LCA-0010	N	PL PL	Fuerte hipermetropía antes de la operación de cataratas	Pálido	Disminución de calibre	Acúmulos gruesos de pigmento repartidos por todo el FO	Hiperpigmentación anular	No	Abolido (52a.)	Nistagmo y estrabismo (exotropía)	Pseudofaquia en ambos ojos	<i>CRB1</i> c.478-481insG hom
LCA-0011	N	CD 0,1	+2.5(+2) +2.5(+1.5)	Pálido	Disminución de calibre	Sal y pimienta con pigmento en espículas, hiperpigmentación y puntos blanquecinos granular localizada en el polo posterior	EPR alterado	Si (periferia temporal)	Abolido (7a.)	Nistagmo y estrabismo (exotropía)	Signo oculodigital	<i>CRB1</i> p.Cys948Tyr het <i>CRB1</i> c.2244-47delATC het
LCA-0019	1a.	PLPL	+5.25 +5.25	Hiperémico	Disminución de calibre	Puntos blanquecinos de pequeño tamaño y pigmentación numular repartido por todo el fondo de ojo	EPR alterado	No	ND	Nistagmo	Signo oculodigital, enoftalmos y cataratas posteriores subcapsulares.	<i>CRB1</i> c.611 delAAATAGG het <i>CRB1</i> c.2227delG het
LCA-0027 (Fig. 4.34)	N	0,05 0,05	+8(+4) +7(+3)	Normal	Ligera disminución de calibre	Sal y pimienta, puntos blanquecinos mezclados con hiperpigmentación granular	EPR alterado	No	Abolido (3a.)	Nistagmo	Segmento anterior normal	<i>CRB1</i> p.Cys948Tyr het <i>CRB1</i> p.Glu1330ter het
LCA-0028 (Fig. 4.35)	1a.	CD CD	+5..5(+3) +5..5(+3)	Drusas	Normal	Atrofia del epitelio pigmentario con drusas e hiperpigmentación numular en la media perferia con puntos blanquecinos	EPR alterado	No	Abolido (5a.)	Nistagmo	Segmento anterior normal	<i>CRB1</i> p.Cys948Tyr het <i>CRB1</i> p.Ile1100Thr het

ED - Edad del diagnóstico **AV** - Agudeza Visual **N** - Nacimiento **ND** - No hay Datos **PL** - Percepción de luz **CD** - Cuenta dedos **hom** - homocigosis **het** - heterocigosis
PPRPE - Epitelio paraarteriolar preservado **EPR** - Epitelio pigmentario de la retina **ERG** - Electrorretinograma

Tabla 4.18. Correlación genotipo-fenotipo en familias LCA y RP-IP con dos mutaciones en el gen *CRB1*.

Familia	ED	AV	Error de refracción	Fondo de ojo					ERG (edad)	Movilidad	Biomi-croscopía	Mutaciones
				Disco óptico	Vasos	Descripción	Mácula	PPRPE				
LCA-0032	N	CD CD	+4.5(+2) +5(+1.5)	Normal	Normal	Hiperpigmentación numular y puntos blanquecinos a nivel del EPR en el polo posterior	Hiperpigmentación numular	No	Abolido (2a.)	Nistagmo	Segmento anterior normal	<i>CRB1</i> p.Cys948Tyr het <i>CRB1</i> p.Leu535Pro het
LCA-0038 (V:1) (Fig. 4.36)	N	15/25 binocular, pigassou	+1.75 (+1) +1.75 (+1)	Normal	Ligera disminución de calibre	Alteración en sal y pimienta con puntos blanquecinos	En forma de ojo de buey	Si (parte superior de la retina)	Abolido (1a.)	Nistagmo	Segmento anterior normal	<i>CRB1</i> p.Cys896ter het <i>CRB1</i> p.Ile1001Asn het <i>RPGRIP1</i> p.Gln589His het
LCA-0038 (III:6) (Fig. 4.37)	3a.	PL PL	ND	Pálido	Disminución de calibre	Parénquima con pigmento redondeado difuso en cantidad abundante junto a importante atrofia coriocapilar	EPR alterado	No	ND	No nistagmo	Pseudofaquia en ambos ojos	<i>CRB1</i> p.Ile1001Asn het <i>CRB1</i> p.Asp564Thr het <i>RPGRIP1</i> p.Gln589His het
RP-0025	4a.	CD 0,005	+10(+2) +12(+3)	Pálido	Normal	Pigmento en osteoclastos pre y retroecuatorial	Desestructurada	No	Abolido (33a.)	ND	Segmento anterior normal	<i>CRB1</i> p.Ile1100Thr hom
RP-0280 (Fig. 4.38)	2a.	ND	ND	Normal	Disminución de calibre	Acúmulos gruesos de pigmento repartidos por todo el FO con pigmento en espículas y puntos blanquecinos	Mácula desestructurada	Si	Abolido (16a.)	Nistagmo	ND	<i>CRB1</i> p.Cys948Tyr het <i>CRB1</i> p.Trp822ter het
ED - Edad del diagnóstico AV - Agudeza Visual N - Nacimiento ND - No hay Datos PL - Percepción de luz CD - Cuenta dedos hom - homocigosis het - heterocigosis PPRPE - Epitelio paraarteriolar preservado EPR - Epitelio pigmentario de la retina ERG - Electrorretinograma												

Tabla 4.18. Correlación genotipo-fenotipo en familias LCA y RP-IP con dos mutaciones en el gen *CRB1*.

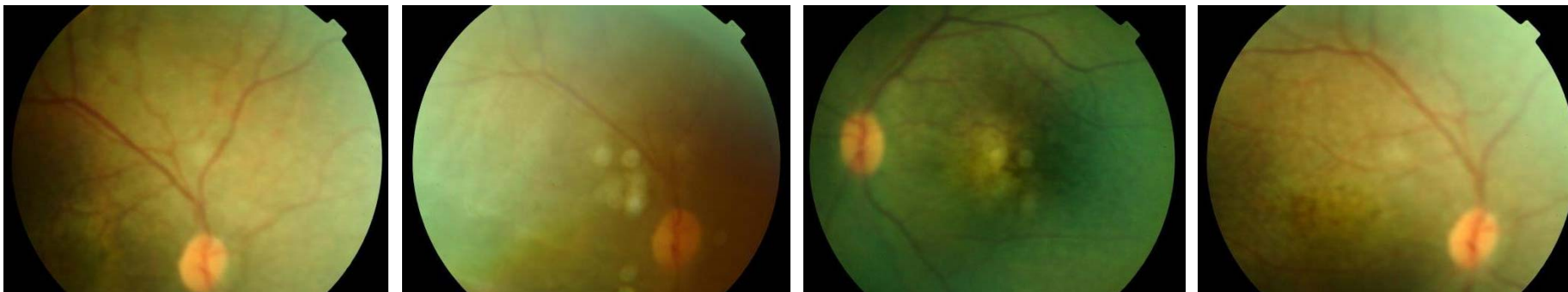


Figura 4.34. Familia LCA-0027, *probandus*. Sal y pimienta, puntos blanquecinos mezclados con hiperpigmentación granular. Vasos con ligera disminución de calibre. [Cortesía de Dra. García-Sandoval y Dr. Tapias, Servicio de Oftalmología de la FJD].

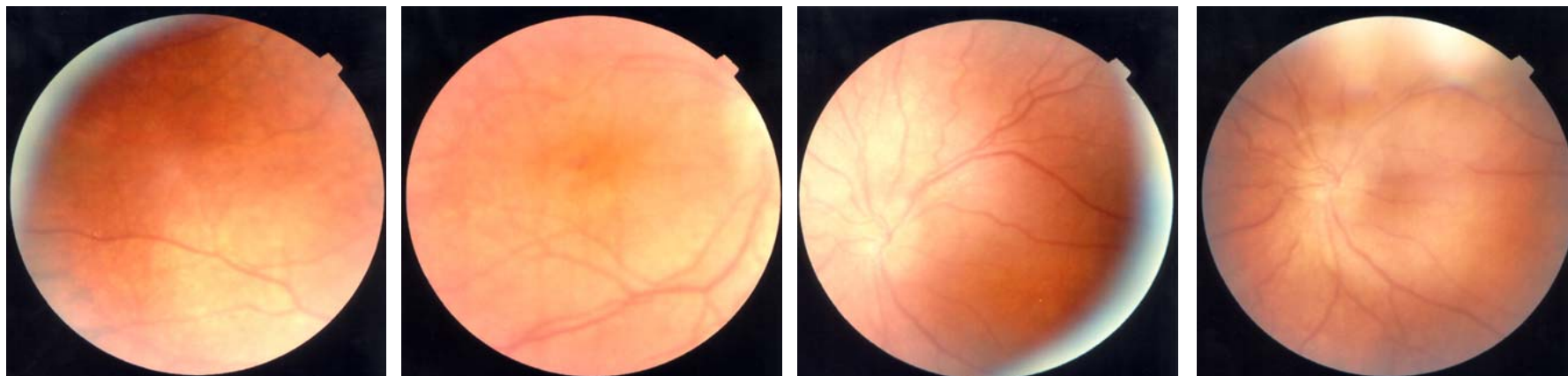


Figura 4.35. Familia LCA-0028, *probandus*. Atrofia del epitelio pigmentario con drusas e hiperpigmentación numular en la media periferia con puntos blanquecinos. [Cortesía de Dra. García-Sandoval y Dr. Tapias, Servicio de Oftalmología de la FJD].

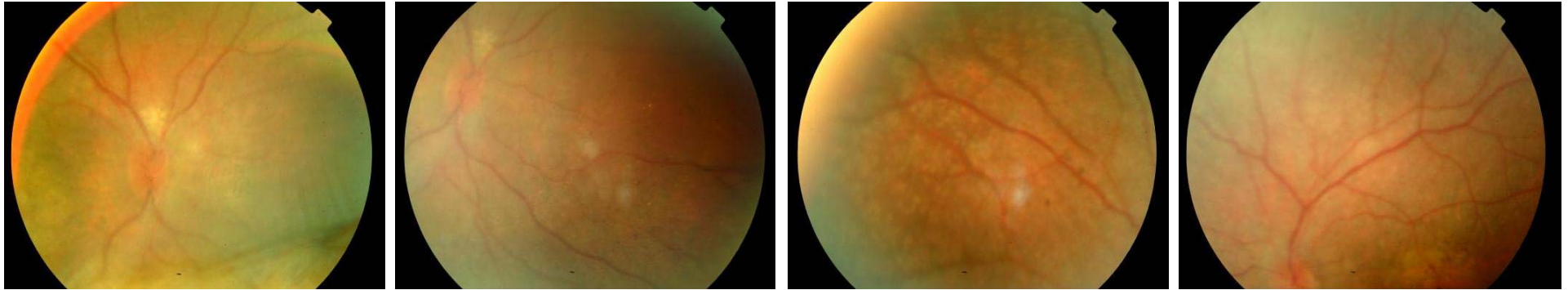


Figura 4.36. Familia LCA-0038, paciente V:I. Alteración en sal y pimienta con puntos blanquecinos. Vasos con ligera disminución de calibre. Preservación del epitelio paraarteriolar. [Cortesía de Dra. García-Sandoval y Dr. Tapias, Servicio de Oftalmología de la FJD].

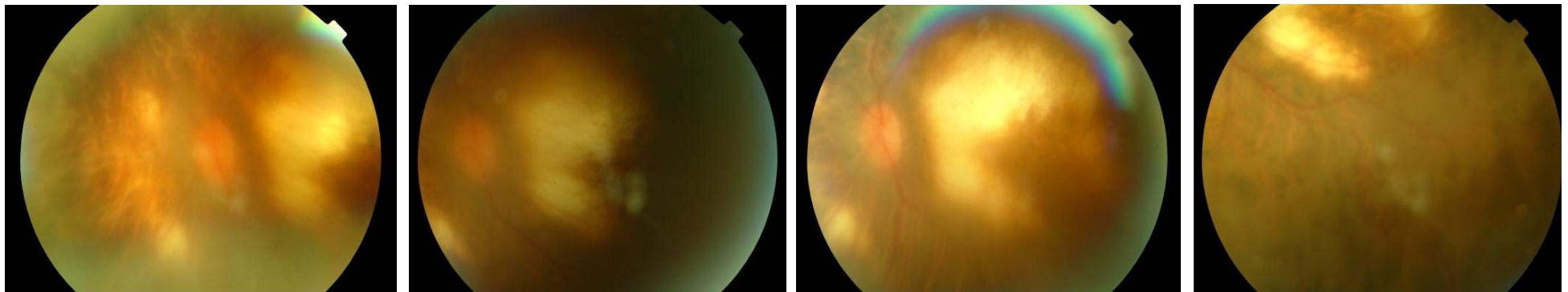


Figura 4.37. Familia LCA-0038, paciente III:6. Parénquima con pigmento redondeado difuso en cantidad abundante junto a importante atrofia coriocalilar. Vasos disminuidos de calibre. [Cortesía de Dra. García-Sandoval y Dr. Tapias, Servicio de Oftalmología de la FJD].

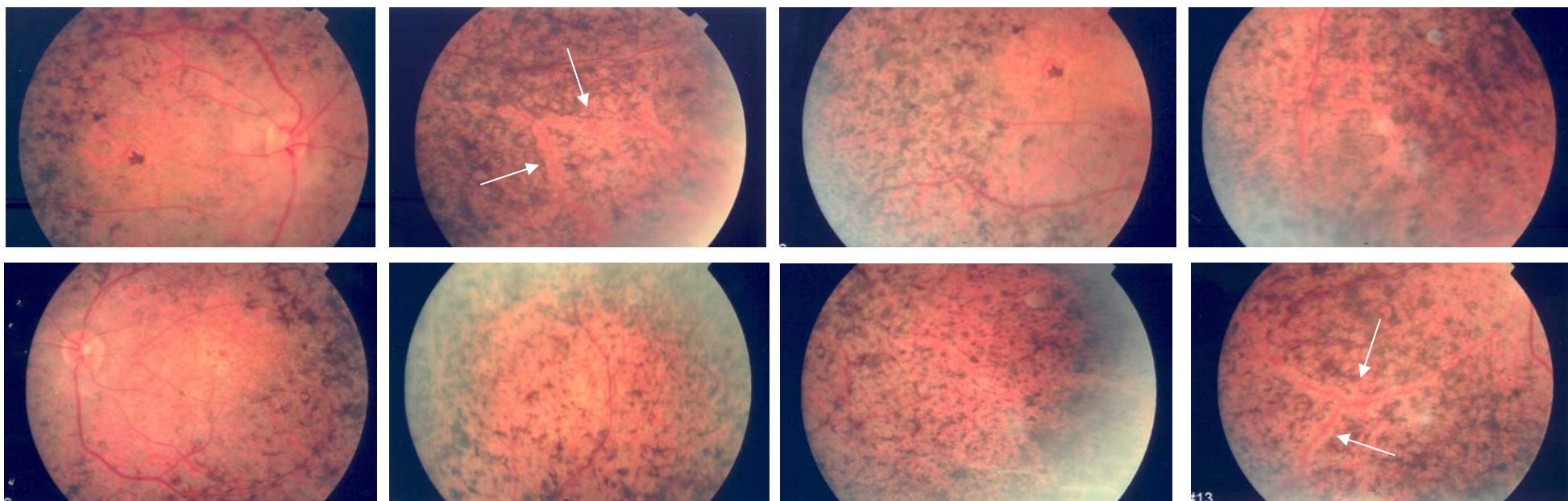


Figura 4.38. Familia RP-0280, *probandus*. Acúmulos gruesos de pigmento repartidos por todo el FO con pigmento en espículas y puntos blanquecinos. Vasos disminuidos de calibre. Preservación del epitelio paraarteriolar (flechas blancas). [Cortesía de Dra. García-Sandoval y Dr. Tapias, Servicio de Oftalmología de la FJD].

4.5.2. Gen *CEP290*

Familia	Disminución			Fondo de Ojo (edad)	ERG (edad)	Movilidad	Otros	Mutación 1	Mutación 2	Mutación 3
	CN	CV	AV							
LCA-0006	N	N	N	Normal (6m.)	Abolido (2m.)	Nistagmo y enoftamos	-----	<i>CEP290</i> p.Cys998ter	-----	-----
LCA-0037	N	N	N	Típico de RP muy avanzado (37a.)	Abolido (31a.)	Nistagmo y keratocono	Epilepsia (8a.)	<i>CEP290</i> p.Cys998ter	<i>CEP290</i> p.Cys998ter	<i>RPGRIP1</i> p.Gln589His
LCA-0039	N	N	N	ND	ND	ND	-----	<i>CEP290</i> p.Cys998ter	<i>CEP290</i> p.Cys998ter	<i>RPGRIP1</i> p.Thr806Ile
LCA-0043	N	N	N	Papilas pálidas	ND	Nistagmo	-----	<i>CEP290</i> p.Cys998ter	-----	-----
RP-1146	1a.	1a.	1a.	Normal	ND	Nistagmo	-----	<i>CEP290</i> p.Lys1575ter	-----	-----

CN - Ceguera Nocturna **CV** - Campo Visual **AV** - Agudeza Visual **N** - Nacimiento **ND** - No hay Datos

Tabla 4.19. Correlación genotipo-fenotipo en familias LCA y RP-IP con dos mutaciones en el gen *CEP290*.

4.5.3. Gen *RDH12*

Familia	Disminución			Fondo de Ojo (edad)	ERG (edad)	Movilidad	Mutación 1	Mutación 2
	CN	CV	AV					
LCA-0020	18m.	2a.	2a.	Alteraciones del epitelio pigmentario retiniano, dispersos por toda la periferia retiniana (2a.)	Abolido (4a.)	Nistagmo	<i>RDH12</i> p.Leu99Ile	<i>RDH12</i> c.102ins4
RP-0184_3	2a.	2a.	4a.	Papilas rosadas de aspecto normal en ambos ojos. Coriorretinas con dispersión pigmentaria condensada en acúmulos osteoclastiformes que alcanzan la retina periférica y la central, con excepción en esta última de las áreas maculares (4a.)	Subnormal (4a.)	Nistagmo	<i>RDH12</i> p.Thr49Met	<i>RDH12</i> p.Thr49Met

CN - Ceguera Nocturna **CV** - Campo Visual **AV** - Agudeza Visual **N** - Nacimiento **ND** - No hay Datos

Tabla 4.20. Correlación genotipo-fenotipo en familias LCA y RP-IP con dos mutaciones en el gen *RDH12*.



“La bola de cristal”
John William Waterhouse, 1902

DISCUSIÓN

“Todos somos muy ignorantes,
lo que ocurre es que no todos ignoramos las mismas cosas”

Albert Einstein

5.1. Esquema general de la discusión

En los últimos 15 años se ha producido un aumento espectacular del conocimiento acerca de la fisiopatología de las distrofias de retina (DR), habiéndose mapeado 190 genes, con sólo 138 identificados hasta el momento (RetNet, 19 de diciembre de 2007). Las mutaciones en estos genes pueden producir distintas formas clínicas y hereditarias de DR, comprobándose que estas enfermedades son excepcionalmente heterogéneas.

En el caso de la LCA, DR congénita donde los bastones y los conos se pierden o no son funcionales en los primeros años de vida o al nacimiento, el número de genes identificados asciende a 13 y son 2 las localizaciones genéticas adicionales mapeadas.

Este estudio pretende enfatizar el hecho de que la identificación de mutaciones en el genoma humano es una condición necesaria para entender las enfermedades hereditarias. Es necesario conocer el espectro completo de estos cambios a lo largo del genoma y de las consecuencias metabólicas que conllevan. Esto es especialmente complejo en la LCA debido a su gran heterogeneidad tanto clínica como genética.

Pese a los grandes logros obtenidos en el campo de la oftalmología y la genética, todavía existe una cantidad importante de personas que sufren estos graves defectos visuales y para los cuales aún no existe un tratamiento eficaz.

En este apartado se realizará primero un análisis de los cambios frecuentes, para discutir las razones que han llevado a considerarlas polimorfismos o mutaciones. A continuación se discutirán los resultados obtenidos en cada uno de los genes estudiados, dando especial importancia a las familias digénicas y/o trialélicas.

Después se repasará el espectro mutacional obtenido en población LCA y RP-IP española, completándolo con un análisis de distribución geográfica.

Y finalmente se llevará a cabo un estudio de correlación genotipo-fenotipo en los genes *CRB1*, *CEP290* y *RDH12*.

5.2. Cambios frecuentes: mutaciones patogénicos *versus* polimorfismos

Tras el análisis estadístico realizado en el apartado de pacientes y métodos para el estudio de las cuatro mutaciones más frecuentes, se consideró que son polimorfismos y no mutaciones patogénicas, por lo que se decidió no considerarlas en el análisis de frecuencia de mutaciones y genes implicados. A continuación se discuten los motivos que han llevado a esta conclusión.

5.2.1. Cambio p.Asp1114Gly en *RPGRIP1*

El aminoácido p.Asp1114 en *RPGRIP1* se encuentra en todas las isoformas de la proteína y está altamente conservado en los vertebrados. El cambio p.Asp1114Gly está situado en la región C-terminal que pertenece al dominio RID que interacciona con *RPGR* [Gerber *et al.*, 2001].

El cambio fue detectado por primera vez en una familia consanguínea de Marruecos, y la mutación se presentaba en homocigosis. También estudiaron 250 cromosomas y no detectaron la mutación en ninguno de ellos [Gerber *et al.*, 2001].

Por ello podría tratarse de una asociación fortuita entre la mutación y la patología. Y por tanto, tratarse de un polimorfismo presente en homocigosis debido a la consanguinidad de los padres del paciente. Además el paciente no tenía hermanos por lo que no se pudo establecer la segregación de la mutación.

Lu *et al.* [2005] determinaron que esta mutación, aboliría el lugar funcional de interacción con el gen *RPGR*. No obstante esta evidencia, en este trabajo no se ha visto ninguna prueba de su papel patogénico en las 177 familias estudiadas, no cosegrega con la enfermedad en las familias que presentan este cambio y a su vez, el estudio estadístico confirma que su frecuencia en población control es igual a la de los pacientes.

5.2.2. Cambio p.Pro701Ser en *GUCY2D*

Zernant *et al.*, [2005] encontraron que el cambio p.Pro701Ser (*GUCY2D*) cosegregaba con la enfermedad en tres familias. En 2 de ellas no encontraron la segunda mutación que justificase el fenotipo y en la tercera, el paciente tiene otra mutación en heterocigosis en el gen *GUCY2D*. Detectan este cambio en un 5% de sus pacientes, y al realizar un estudio en población control lo detectan en un 2% de los mismos. Consideran que este cambio podría ir asociado a otra mutación que estuviera en *cis* en el gen *GUCY2D*.

Sin embargo, nuestros datos familiares no son concluyentes y no se puede, por lo tanto, confirmar esta hipótesis. En los tres árboles donde se ha podido hacer el estudio de segregación se observa que los afectados tienen un haplotipo diferente a los de sus hermanos sanos (Fig. 4.7) y si se tiene en cuenta el aminoácido en vertebrados se observa que no está conservado.

Yoshida *et al.*, [2006] también consideraron esta mutación como modificadora, concluyendo que el microarray de LCA no serviría únicamente para detectar mutaciones patogénicas sino para detectar también cambios modificadores del fenotipo. Llevaron a cabo un estudio en población control (sin reportar las respectivas frecuencias alélicas) donde observaron que algunos controles portaban la mutación en heterocigosis.

Zernant *et al.*, [2005] dividen las mutaciones encontradas por el microarray en dos grupos, el primero está compuesto por las mutaciones que aparecen una sola vez en los pacientes y un segundo grupo que se compone de las variantes que tienen una frecuencia mayor a la esperada para un alelo de alta penetrancia. Entre este segundo grupo incluyen cambios como p.Asp1114Gly en *RPGRIP1* (apartado anterior) y p.Pro701Ser en *GUCY2D*.

Una publicación reciente [Henderson *et al.*, 2007] destaca la frecuencia de la mutación p.Pro701Ser en *GUCY2D* en pacientes con RP-IP y hacen un análisis en población control, donde observan que la frecuencia en ambos grupos es igual. Por lo que concluyen que es un polimorfismo. Al igual que nuestros resultados.

5.2.3. Cambio p.Tyr134Phe en *AIPL1*

Perrault *et al.*, [2003a] reportan esta mutación como patogénica aunque no muestran datos de estudios en población control ni su frecuencia alélica. Además, el estudio de la evolución del aminoácido en vertebrados revela que está altamente conservado.

En nuestros pacientes no se ha podido descartar la implicación de este cambio en la patología ya que no se disponía de muestra de los familiares o el estudio familiar no era informativo (Fig. 4.6).

Se ha llevado a cabo la secuenciación del gen completo en todos los pacientes que presentan mutaciones en *AIPL1* (Tabla 4.11), incluso en el grupo de pacientes que presentaba el cambio p.Tyr134Phe aunque se considerase un polimorfismo. El hecho de no haber encontrado la segunda mutación en ninguno de ellos, refuerza la hipótesis de que sea un polimorfismo.

5.2.4. Mutación p.Cys948Tyr en *CRB1*

La mutación en *CRB1* (p.Cys948Tyr) implica la sustitución de una Cisteína por una Tirosina, siendo el aminoácido Cisteína está implicado en la formación de puentes disulfuro para el correcto mantenimiento de la estructura tridimensional de la proteína y así estabilizar su conformación. La pérdida de este aminoácido por una Treonina, que es débilmente ácido supone una grave pérdida para la proteína. Ambos aminoácidos son neutros polares, pero su conformación es muy diferente. Además puede observarse en la figura 5.1, que la conservación del aminoácido a lo largo de la evolución de vertebrados es muy alta, lo que corrobora la importancia de esa Cisteína.

El cambio p.Cys948Tyr altera la 4ª Cisteína conservada del 14º dominio EGF-*like* (Fig. 5.1), el cuál está implicado en la formación de puentes disulfuro y por lo tanto en el correcto plegamiento de dicho dominio [den Hollander *et al.*, 2001b].

De acuerdo con nuestros resultados, la mutación en *CRB1* (p.Cys948Tyr) es un cambio patogénico, ya que es significativamente más frecuente en pacientes que en los controles y además en varias familias la mutación cosegrega con la enfermedad (Fig. 4.5).

Hay otros autores que confirman la patogenicidad de esta mutación [den Hollander *et al.*, 1999; Hanein *et al.*, 2004; Booij *et al.*, 2005 y Yzer *et al.*, 2006]. Se considera una mutación asociada a un fenotipo grave [den Hollander *et al.*, 2001b].

Por lo que hasta el momento todos los estudios apoyan su papel patogénico.

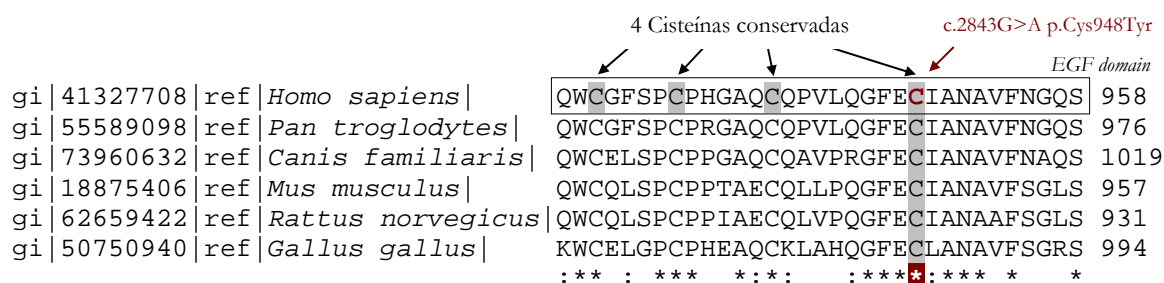


Figura 5.1. Conservación en vertebrados del aminoácido Cisteína 948 implicado en la mutación p.Cys948Tyr en el gen *CRB1*. "*" indica que esa posición está completamente conservada, ":" indica que esa posición está muy conservada, "." indica que esa posición está poco conservada.

Es la mutación más frecuente de todas las encontradas en este trabajo, presente en 6 de 29 alelos *CRB1* (21%). En otras poblaciones también es la mutación más frecuente de todos los alelos mutados encontrados en *CRB1*, en una revisión del año 2004 [den Hollander *et al.*, 2004] se observa que el 26% de los alelos mutados en *CRB1* presentan el cambio p.Cys948Tyr.

Por estos motivos, y considerando los resultados estadísticos se puede concluir que las mutaciones p.Asp1114Gly (*RPGRIP1*), p.Pro701Ser (*GUCY2D*) y p.Tyr134Phe (*AIPL1*) no son cambios patogénicos sino que deben ser considerados como polimorfismos proteicos no patogénicos o quizás sólo modificadores del fenotipo, es decir responsables de casos trialélicos.

5.3. Cribado de genes candidatos

Se discutirán a continuación las familias con mutaciones en los genes estudiados en este trabajo. En una primera parte se expondrán los resultados generales obtenidos para un gen en concreto y finalmente se hará una relación de las familias con sospecha de digenismo y/o trialelismo de este estudio.

5.3.1. Estudio del gen *CRB1*

El gen *CRB1* es el que presenta mayor tasa de mutación tanto en pacientes LCA como RP-IP en población española. Este trabajo ha puesto de manifiesto que es el gen responsable del 20,41% de las familias LCA y del 6,25% de las de RP-IP españolas. A continuación se detallan los hallazgos obtenidos en el gen *CRB1*.

En otras poblaciones el espectro de pacientes LCA con mutaciones en *CRB1* varía de 0% hasta un 15,5% [Zernant *et al.*, 2005 y Yzer *et al.*, 2006]. En el apartado 5.7.1. Familias con mutaciones en *CRB1*, se discutirá el gradiente mutacional de este gen a nivel mundial.

5.3.1.1. *CRB1*: Mutación p.Ile205Thr

La mutación p.Ile205Thr es el segundo cambio más frecuente en el gen *CRB1* en nuestro estudio. Por ello, y por la controversia que sobre este cambio se puede observar en la literatura, se discute a continuación su papel patogénico.

En cambio p.Ile205Thr en el gen *CRB1* se ha visto en 3 familias (LCA-0012, LCA-0042 y RP-0310, figuras 4.10, 4.11 y 4.12, respectivamente), pero al hacer el estudio del gen completo, no se ha encontrado la segunda mutación esperable que confirmara el papel de *CRB1* como gen responsable de la patología.

La primera vez que se publicó esta mutación fue en una familia española con ARRP, por Bernal *et al.* [2003], los cuales la consideraban como un cambio patogénico.

Algunas publicaciones más recientes en población holandesa, concluyen que el cambio p.Ile205Thr es un polimorfismo. Booij *et al.*, [2005] detectaron el cambio sólo una vez en sus pacientes y no encontraron segregación con el fenotipo ARRP.

Den Hollander *et al.*, [2004] también lo consideran polimórfico tras observar que no cosegrega con la enfermedad en las familias donde se ha encontrado, aunque comentan el hecho de no haber encontrado este cambio en 192 controles analizados. Según los autores esto puede sugerir que es un cambio infrecuente que no tiene ningún efecto sobre el fenotipo.

Cuando se inició este trabajo, este cambio era considerado una mutación por tres motivos: el grupo de Bernal *et al.* [2003] había visto que cosegregaba con la enfermedad en una familia, el microarray específico de LCA lo presentaba como una mutación y en una de las familias del estudio, la LCA-0012, también cosegregaba con la enfermedad.

Por ello, en las tres familias LCA-0012, LCA-0042 y RP-0310 (Tabla 4.6), se secuenció todo el gen, no encontrándose ninguna otra variación. Por este último motivo se consideró la posibilidad de que este cambio fuera, efectivamente un polimorfismo proteico o que pudiera tener, como en el caso de los tres cambio citados anteriormente, un papel modificador del fenotipo, siendo responsable de casos trialélicos.

La mutación p.Ile205Thr implica un cambio de Isoleucina, aminoácido neutro no polar, por una Treonina, aminoácido neutro polar. La Isoleucina suele encontrarse en el interior de las proteínas debido a su gran tamaño y juegan un papel importante en el plegamiento porque generan interacciones hidrofóbicas, en cambio la Treonina puede formar enlaces de hidrógeno y su fosforilación regula la actividad enzimática, además el grupo hidroxilo es bastante reactivo en ciertos centros activos. Lo esperable es que este cambio altere la proteína.

Si se observa la evolución del aminoácido en vertebrados se puede ver que está muy conservado (Fig. 5.2).

En el estudio realizado en 100 controles de esta mutación, no se encontró ninguna de las secuencias alteradas.

				EGFCA domain	c.614C>T p.Ile205Thr	
gi	41327708	ref	<i>Homo sapiens</i>	CASDPCKNEATCLNE	I	GRYTCICPHNYSGVNCE 222
gi	55589098	ref	<i>Pan troglodytes</i>	CASDPCKNEATCLNE	I	GRYTCICPHNYSGVNCE 240
gi	73960632	ref	<i>Canis familiaris</i>	CVSDPCKNEATCLNE	I	GRYTCICPRDYSGVNCE 287
gi	18875406	ref	<i>Mus musculus</i>	CVSDPCKNEAVCLNE	I	GRYTCVCPQEFSGVNCE 221
gi	62659422	ref	<i>Rattus norvegicus</i>	CVSDPCMNEAVCLNE	I	GRYTCVCPQEYS----- 191
gi	50750940	ref	<i>Gallus gallus</i>	CVSDPCLNGATCLNL	I	GRYYCICPLGYTGVNCE 160
				* . *****	* * . *****	* **** *:*** ::

Figura 5.2. Conservación en vertebrados del aminoácido Isoleucina 205 implicado en la mutación p.Ile205Thr en el gen *CRB1*. "*" indica que esa posición está completamente conservada, ":" indica que esa posición está muy conservada, "." indica que esa posición está poco conservada.

Analizando en conjunto los resultados obtenidos, no se puede descartar el papel patogénico de la mutación p.Ile205Thr. Ya que, aunque en nuestras familias, en ninguno de los casos se ha detectado la segunda mutación en *CRB1* que justifique el fenotipo, hay una familia LCA-0012 donde cosegrega con la patología. Y al analizar el cambio evolutivamente, se observa que el aminoácido está muy conservado. Estos datos junto al estudio en 100 controles donde no se ha detectado el cambio apoyan su posible papel patogénico o, al menos, un papel modificador del fenotipo.

5.3.1.2. *CRB1*: Nuevas mutaciones identificadas

Gracias al cribado completo del gen *CRB1* se han identificado 6 mutaciones nuevas de las que a continuación se discute su papel patogénico. Para todas aquellas que no implicaban cambio en el marco de lectura o aparición de un codón de parada, se realizó el estudio en 100 controles donde no se encontró ninguna de las mutaciones. Se han detectado 3 cambios de un aminoácido por otro (*missense*), 2 mutaciones sin sentido (*nonsense*) y 1 inserción, que da lugar a un cambio en el marco de lectura.

El cambio p.Leu535Pro se detectó en la familia LCA-0032 (Tabla 4.5). Tanto la Leucina como la Prolina son aminoácidos neutros no polares, lo que no influye en la carga de la proteína, en cambio la estructura de la Prolina es muy diferente de la Leucina, ya la característica principal de la Leucina es el papel que juega en el plegamiento generando interacciones hidrofóbicas, mientras que la Prolina tiene una estructura muy rígida que interfiere en el plegamiento de las proteínas y obliga a la formación de codos en la proteína.

Observando la conservación del aminoácido a lo largo de la evolución de vertebrados (Fig. 5.3) se ve que está altamente conservado. El cambio tiene lugar dentro del dominio Lámina G, cuya función principal es la de unión entre proteínas.

Estos datos, junto con el análisis familiar que confirma la cosegregación y el estudio en 100 controles, donde no se ha detectado en ninguno de ellos, confirma la patogenicidad de esta mutación.

				LAMG domain	c.1604T>C p.Leu535Pro
gi	41327708	ref	<i>Homo sapiens</i>	NIALRFQTVQPMALLLFRSNRDVFK	LELLSGY 541
gi	55589098	ref	<i>Pan troglodytes</i>	DIALRFQTVQPMALLLFRSNRDVFK	LELLSGY 559
gi	73960632	ref	<i>Canis familiaris</i>	NMALSFLTQVQPMALLLFRGNRAMFIM	LELRGGY 602
gi	18875406	ref	<i>Mus musculus</i>	NISLRFHTVQPNALLLIRGNKDVSMK	LELLNGC 540
gi	62659422	ref	<i>Rattus norvegicus</i>	NISLKFQTVQPNALLLVRGNKDMSVK	LELLDGC 449
gi	50750940	ref	<i>Gallus gallus</i>	NINLRFQTVQPTAFLFYRGEKDTFVK	LELLNGY 577
				:: * * * * *	:: * * * * *

Figura 5.3. Conservación en vertebrados del aminoácido Leucina 535 implicado en la mutación p.Leu535Pro en el gen *CRB1*. "*" indica que esa posición está completamente conservada, ":" indica que esa posición está muy conservada, "." indica que esa posición está poco conservada.

La mutación p.Asp564Thr detectada en la familia LCA-0038 (Tabla 4.6), implica un cambio de Ácido Aspártico, en la posición 564 del gen *CRB1*, por el aminoácido Treonina. El Ácido Aspártico se encuentra en el centro activo de las enzimas *ATPasas*, mientras que la Treonina es un aminoácido polar no muy reactivo que puede formar enlaces de hidrógeno y su fosforilación regula la actividad enzimática.

A su vez este cambio está completamente conservado en vertebrados como se observa en la figura 5.4. Al igual que en los dos casos anteriores este resultado junto con el estudio familiar y el análisis en 100 controles confirman la patogenicidad de la mutación.

				c.1690G>T p.Asp564Thr	LAMG domain	
gi	41327708	ref	<i>Homo sapiens</i>	HNTSDGEWHFVEVIFAEAVTLTLIDDSCKEKC	591	
gi	55589098	ref	<i>Pan troglodytes</i>	HNTSDGEWHFVEVIFAEAVTLTLIDDSCKEKC	609	
gi	73960632	ref	<i>Canis familiaris</i>	HDTSDGAWHSVEVTFAEAVTLTLLDNTCKEKC	652	
gi	18875406	ref	<i>Mus musculus</i>	HNTSDGEWHFVEVTIAETLTLALVGGSCKEKC	590	
gi	62659422	ref	<i>Rattus norvegicus</i>	HNTSDGEWHLVEVTFAETITLALNGSSCKEKC	499	
gi	50750940	ref	<i>Gallus gallus</i>	HNVS DGEWHSVEVTLARAVTLNLLDSSCAESC	627	
				*:.*** ** *** :*.:*** * ..:* **		

Figura 5.4. Conservación en vertebrados del aminoácido Ácido Aspártico 564 implicado en la mutación p.Asp564Thr en el gen *CRB1*. "*" indica que esa posición está completamente conservada, ":" indica que esa posición está muy conservada, "." indica que esa posición está poco conservada.

También en la familia LCA-0038 (Tabla 4.6), se ha detectado la mutación p.Ile1001Asn. Este cambio da lugar a un cambio de Adenina por Timina en la posición nucleotídica 3002, lo que implica un cambio de Isoleucina por Asparagina en el aminoácido 1001. La Isoleucina es un aminoácido neutro no polar que suele encontrarse en el interior de las proteínas debido a su tamaño. Juega un papel importante en el plegamiento porque genera interacciones hidrofóbicas, en cambio la Asparagina es un aminoácido neutro polar que se encuentra en el centro activo de las enzimas *ATPasas*, esto implica cambios importantes en la proteína.

Este aminoácido está altamente conservado a lo largo de la evolución (Fig. 5.5) y está situado en la Lámina G, cuya función es la de unión a otras proteínas. El análisis familiar junto con el estudio de 100 controles confirma la patogeneicidad de esta mutación.

				LAMG domain	c.3002A>T p.Ile1001Asn	
gi	41327708	ref	<i>Homo sapiens</i>	EKEPEFLNISIQDSRLFFQLQSGNSFYMLSLTS	1025	
gi	55589098	ref	<i>Pan troglodytes</i>	EKEPEFLNISIQDSRLFFQLQSGNSFYTLTLTS	1043	
gi	73960632	ref	<i>Canis familiaris</i>	KKEPEFLNISIRDSRLFFQLQSGNSFYMLSLTS	1086	
gi	18875406	ref	<i>Mus musculus</i>	EKEPEFLNISIQDARLFFQLRSGNSFYTLHLMG	1024	
gi	62659422	ref	<i>Rattus norvegicus</i>	EKEPEFLNISIQDSRLFFQLRSGNSFYTLHLTG	998	
gi	50750940	ref	<i>Gallus gallus</i>	EKEPEFVIISIHNSKLVFQLQSGNNFYMLTLTS	1061	
				:*****: *:::*.*****.* * *		

Figura 5.5. Conservación en vertebrados del aminoácido Leucina 1001 implicado en la mutación p.Ile1001Asn en el gen *CRB1*. "*" indica que esa posición está completamente conservada, ":" indica que esa posición está muy conservada, "." indica que esa posición está poco conservada.

La mutación p.Trp822ter, detectada en la familia RP-0280 (Tabla 4.5), causa la aparición de un codón de parada prematuro en el aminoácido 822 de *CRB1*. Esto da lugar a una proteína truncada con la consiguiente alteración funcional de la misma.

La mutación p.Glu1330ter, encontrada en la familia LCA-0027 (Tabla 4.5) provoca la aparición de un codón de parada prematuro en el aminoácido 1330, lo que altera la conformación de la proteína que queda truncada y por tanto su función alterada o nula.

La mutación c.2227delG en *CRB1* es una delección de una Guanina que altera el marco de lectura de la proteína desde el aminoácido 743. Esta mutación ha sido detectada en la familia LCA-0019 (Tabla 4.5) y causa la aparición de un codón de parada prematuro que altera la conformación de la proteína.

5.3.1.3. *CRB1*: Familias con una sola mutación en heterocigosis

En un grupo de tres familias (RP-0091, RP-0457 y RP-0617, tabla 4.5) que presentan una única mutación en *CRB1*, tras el cribado del gen no se ha encontrado la segunda mutación que justifique el fenotipo y además ninguna presenta cambios en otros genes estudiados.

El hecho de no haber encontrado mutaciones en el cribado de los exones de *CRB1*, no significa necesariamente que no existan alteraciones. El estudio mediante secuenciación se ha realizado sólo en los exones constitutivos, por lo que algunas regiones como las intrónicas o próximas al gen no han sido estudiadas. Además el análisis realizado no permite detectar grandes delecciones e inserciones en heterocigosis.

A su vez, hay otras 5 familias que presentan una primera mutación en *CRB1* y una segunda mutación en otro gen (LCA-0012, LCA-0042, RP-0310, RP-0137 y RP-1017, tabla 4.6). Estas familias se discutirán en el apartado 5.4 como posibles familias digénicas o trialélicas.

También cabe la hipótesis de que en estas familias el modelo de herencia no sea el mendeliano clásico y estemos ante casos digénicos donde no ha sido identificada la mutación en el otro gen.

5.3.2. Estudio del gen *CEP290*

El estudio del gen *CEP290* se llevó a cabo mediante el microarray de LCA y a su vez se realizó un cribado de la mutación c.2991_1655A>G mediante secuenciación automática. El hecho de no poder secuenciar el gen completo no ha permitido establecer si *CEP290* es el gen responsable de la patología en las familias donde se ha encontrado únicamente una mutación en heterocigosis.

Las mutaciones en el gen *CEP290* fueron descritas inicialmente como responsables del síndrome de Joubert [OMIM 610188] y el de Senior-Loken [OMIM 610189], [Sayer *et al.*, 2006 y Valente *et al.*, 2006], respectivamente.

Fue den Hollander *et al.*, [2006] quién describió la implicación de este gen en la LCA asociada a una mutación concreta (c.2991_1655A>G). Este cambio crea un nuevo sitio de corte y empalme, creando un exón críptico en el ARNm de *CEP290* [Perrault *et al.*, 2007], este fenómeno provoca que queden restos de la proteína, por lo que sugieren que puede ser suficiente para el funcionamiento normal del cerebelo y la función renal, pero es insuficiente para el correcto funcionamiento de los fotorreceptores. Por ello, el resto de las mutaciones descritas causan los síndromes citados anteriormente, y el cambio c.2991_1655A>G causa sólo LCA.

den Hollander *et al.*, [2006] observaron que la mutación c.2991_1655A>G en *CEP290* representaba una de las mayores causas de LCA, siendo la causa de un 21% de los casos de LCA. También otro grupo [Perrault *et al.*, 2006] confirmó que la alta frecuencia de pacientes con esta mutación, siendo un 22% aproximadamente.

Un trabajo publicado por nuestro grupo [Vallespín *et al.*, 2007c] mostró que en población española el 6% de los pacientes con LCA presentan mutaciones en el gen *CEP290*. Al analizar los resultados estadísticamente, hay diferencias entre nuestra población y las del norte de Europa. A su vez, un artículo publicado recientemente en población italiana [Simonelli *et al.*, 2007], detecta en un 4,2% de los pacientes LCA mutaciones en este gen. Estos resultados sugieren un gradiente norte-sur en la implicación del gen *CEP290* en Europa.

5.3.3. Estudio del gen *RDH12*

Se han detectado mutaciones en este gen en una familia con fenotipo LCA y otra con fenotipo RP-IP (la correlación genotipo-fenotipo de *RDH12* se discutirá mas adelante en el apartado 5.8.3). Las mutaciones en este gen representan el 2% de las familias con fenotipo LCA y el 1% con RP-IP españolas según este estudio. Hay otros estudios que consideran que las mutaciones en *RDH12* causan el 4% de los casos de LCA [Janecke *et al.*, 2004 y Perrault *et al.*, 2004].

Se ha de tener en cuenta, que la familia RP-0184 subfamilia 3, tiene en realidad un fenotipo que se parece más al de LCA que al de RP-IP, por lo que si se reconsiderara el diagnóstico como LCA, nuestros resultados variarían, y se obtendría un 4% de familias LCA con este gen como responsable. Por ello un correcto examen oftalmológico de los pacientes es fundamental.

Respecto a las mutaciones encontradas, existen estudios previos sobre la actividad de *RDH12* para dos de ellas (p.Leu99Ile y p.Thr49Met). En el caso de p.Leu99Ile, se ha visto que se produce una reducción muy acusada en la capacidad de convertir *all-trans* retinal en *all-trans* retinol. En cambio para la mutación p.Thr49Met cambia la eficiencia de la catalización a favor de la conversión de retinal a retinol [Janecke *et al.*, 2004].

La correlación genotipo-fenotipo en el gen *RDH12* se discutirá más adelante en el apartado 5.8.3.

El gen *RDH12* codifica una retinol deshidrogenasa, las cuales catalizan las reacciones de oxidación-reducción del ciclo visual, donde la vitamina A se convierte en 11-*cis* retinal, el cromóforo de los conos y los bastones. Estudios funcionales llevados a cabo por Thompson *et al.*, [2005] sugieren que en la mayoría de los casos, los pacientes con mutaciones *missense* tienen reducida tanto la expresión como la actividad de *RDH12*.

5.3.4. Estudio del gen *AIPL1*

Las mutaciones en el gen *AIPL1* suponen de un 3 a un 20% de los casos de LCA [Sohoki *et al.*, 2000; Hanein *et al.*, 2004 y Zernant *et al.*, 2005].

En este trabajo *AIPL1* representa un poco más de un 2% de todas las familias con fenotipo LCA. Además, en ninguna de ellas se ha encontrado la segunda mutación que justifique el fenotipo.

La diferencia existente entre nuestros resultados y los obtenidos por Zernant *et al.*, [2005] podría ser debido a que en nuestro estudio no se ha considerado como mutación el cambio p.Tyr134Phe considerado como polimorfismo o cambio modificador del fenotipo. Aunque no se puede calcular la frecuencia alélica del cambio p.Tyr134Phe en el artículo ya que no presentan los datos. Otra razón posible que podría explicar estas diferencias, es la variabilidad que existe entre las poblaciones, el 20% de mutaciones se ha detectado en población holandesa y en nuestro caso el 2% es en población española (Fig. 4.24).

[Sohoki *et al.*, 2000] presentan una paciente afecta de LCA con la mutación p.Val96Ile en heterocigosis, y tras la secuenciación completa del gen no encuentran la segunda mutación que justifique el fenotipo. Esta mutación no se encuentra en 50 controles. Finalmente concluyen que es posible que la segunda mutación no se haya detectado porque esté en zonas reguladoras no estudiadas con los cebadores convencionales. En este trabajo la familia RP-1107 (Tabla 4.11) presenta la misma mutación y tampoco se ha detectado el segundo alelo mutado.

Como en los casos anteriores donde se ha secuenciado el gen completo, hay que destacar que el hecho de no haber encontrado la segunda mutación no significa que no existan alteraciones. Ya que se ha realizado sólo la secuenciación de los exones constitutivos, por lo que algunas regiones como las intrónicas o próximas al gen no han sido estudiadas. Tampoco se podrían detectar grandes deleciones o inserciones intragénicas.

En *AIPL1* otros autores concluyen que la mutación más frecuente es p.Trp278ter [Zernant *et al.*, 2005], en cambio en nuestra población el cambio más frecuente es p.Tyr134Phe, del que se ha llegado a la conclusión de que es un polimorfismo. Si no se tiene en cuenta este cambio, la mutación más frecuente en población española es p.Arg38fs, 3 de 4 alelos mutados presentan esta variación (Tabla 4.11).

5.3.5. Estudio del gen *CRX*

En *CRX* se han descrito mutaciones que causan LCA con herencia autosómica dominante [Perrault *et al.*, 2003b y Wang *et al.*, 2007], siendo siempre mutaciones que consisten en cambios en el marco de lectura. En nuestros resultados, todas las mutaciones encontradas son puntuales que dan lugar a un cambio *missense* (Tabla 4.12 y 4.13).

En 2 de las 3 familias con mutaciones en *CRX* en heterocigosis (Tabla 4.12 y 4.13), se estudió si eran *de novo* y, por lo tanto, poder un patrón de herencia autosómico dominante. En ambos casos la mutación era heredad de un progenitor, concluyendo que su patrón de herencia no es autosómico dominante.

En el caso de la familia RP-0862 (Fig. 4.19) se estudió a los hermanos y los hijos de los pacientes que quisieron participar. Se detectó en un hermano de la paciente la mutación en heterocigosis y el estatus del mismo era sano.

En la familia RP-0977 (Fig. 4.20), se había realizado inicialmente el estudio de los dos hijos y la madre, ya que el padre había fallecido. Se observó que no había heredado la mutación de su madre y por lo tanto no se podía descartar si era *de novo* o heredada de su padre. Para ello se solicitaron muestras de la familia paterna, y se comprobó que uno de los tíos paternos presentaba la mutación descartándose así la herencia *de novo* y por tanto la herencia autosómica dominante, ya que este individuo no presentaba fenotipo de distrofia de retina.

El 2% de los casos de LCA son debidos a mutaciones en el gen *CRX* [Lotery *et al.*, 2001a]. En nuestra población no se ha detectado ninguna mutación en este gen en pacientes con LCA, en cambio en pacientes RP-IP se han observado las 3 familias descritas anteriormente, esto supone un 2,34% de las familias RP-IP.

No puede excluirse la existencia de una segunda mutación ya que el cribado del gen ha sido sólo de la parte codificante, mientras que hay regiones que no se han estudiado y tampoco se podrían detectar grandes deleciones o inserciones en heterocigosis.

5.3.6. Estudio del gen *RPGRIP1*

Se ha observado que las mutaciones en este gen causan de un 4 a un 6% de los casos de LCA [Gerber *et al.*, 2001 y Zernant *et al.*, 2005]. En el caso de nuestras familias se han detectado mutaciones en el gen *RPGRIP1* en el 2% de las familias LCA y en 1,56% de las familias RP-IP (Fig. 4.24).

Gerber *et al.*, [2001] así como Zernant *et al.*, [2005], consideran en su espectro mutacional el cambio p.Asp1114Gly, que se ha considerado en este trabajo como un polimorfismo y no se ha contabilizado en nuestro estudio. Por ello, los porcentajes de participación de este gen en LCA, si no se considera ese cambio, disminuiría también en estos estudios.

En el apartado 5.4 se discutirá el papel de *RPGRIP1* como factor modificador junto a mutaciones en otros genes. En este estudio, 7 de las familias de las 9 digénicas o trialélicas presentan mutaciones en este gen (Tabla 4.14 y 4.15).

5.3.7. Estudio del gen *GUCY2D*

Se ha descrito que entre un 6 y un 21% de los casos de LCA son debidos a mutaciones en *GUCY2D* [Lotery *et al.*, 2000; Perrault *et al.*, 2000 y Hanein *et al.*, 2004]. En nuestros resultados no se ha detectado ningún caso en LCA y en RP-IP un 1,56% (Fig. 4.24).

Perrault *et al.*, [2000] detectaron un 20% de mutaciones en el gen *GUCY2D* en pacientes LCA, ninguna de las mutaciones encontradas en este artículo era la considerada polimórfica en este estudio p.Pro701Ser. Hanein *et al.*, [2004] detectan un 21% de mutaciones en este gen, y tampoco ninguna de estas es el cambio polimórfico. Ambos estudios se han realizado en un amplio espectro pacientes con origen en diferentes poblaciones, pero en ningún caso hay pacientes españoles.

Es decir, en otras poblaciones, es *GUCY2D* el gen con mayor tasa de mutación en pacientes LCA, pero no sucede lo mismo en población española.

Al igual que el gen *RPGRIP1*, *GUCY2D* aparece asociado a mutaciones en otros genes (Tablas 4.16 y 4.17), en el apartado 5.4 se discutirá su posible papel modificador.

5.4. Familias digénicas y/o trialélicas

En el desarrollo de este trabajo se han detectado un grupo de 9 familias que presentaban mutaciones en más de un gen, a continuación se discutirá si se trata de casos de digenismo o trialelismo.

El listado de las familias se detalla en la tabla 5.1.

Tabla 5.1. Familias con mutaciones en dos genes

Familia	ADN	Mutación 1	Mutación 2	Mutación 3	Estudio familiar			
					1 ^{er} gen	2 ^o gen	Digenismo	Trialelismo
1	LCA-0038	04/1357 <i>CRB1</i> p.Cys896ter	<i>CRB1</i> p.Ile1001Asn ^N	<i>RPGRIP1</i> p.Gln589His	C	NC	No	No
		03/0945 <i>CRB1</i> p.Ile1001Asn ^N	<i>CRB1</i> p.Asp564Thr ^N	<i>RPGRIP1</i> p.Gln589His				
2	RP-0137	1601 <i>CRB1</i> p.Arg905Gln	<i>RPGRIP1</i> p.Asp1114Gly	-----	NC	NC	No	No
3	RP-0310	95/0259 <i>CRB1</i> p.Ile205Thr	<i>RPGRIP1</i> p.Asp1114Gly	-----	ND	ND	No	No
4	RP-1017	05/1295 <i>CRB1</i> p.Thr745Met	<i>RPGRIP1</i> p.Asp1114Gly	-----	ND	ND	No	Si
5	LCA-0012	99/0186 <i>CRB1</i> p.Ile205Thr	<i>GUCY2D</i> p.Pro701Ser	-----	C	C	No	Si
6	LCA-0042	06/0067 <i>CRB1</i> p.Ile205Thr	<i>GUCY2D</i> p.Pro701Ser	-----	NF	NF	No	Si
7	LCA-0037	05/0454 <i>CEP290</i> p.Cys998ter	<i>CEP290</i> p.Cys998ter	<i>RPGRIP1</i> p.Gln589His	C	NC	No	Si
8	LCA-0039	05/0585 <i>CEP290</i> p.Cys998ter	<i>CEP290</i> p.Cys998ter	<i>RPGRIP1</i> p.Thr806Ile	C	ND	No	Si
9	RP-0977	05/0967 <i>CRX</i> p.Tyr142Cys	<i>RPGRIP1</i> p.Asp1114Gly	-----	ND	ND	No	Si

(^N) - Mutación descrita por primera vez

C – Cosegrega con la enfermedad

NC – No cosegrega

ND – No se puede descartar que cosegregue

NF – No hay familia para realizar el estudio

5.4.1. *CRB1* y *RPGRIP1*: Familia LCA-0038

En la familia LCA-0038 (Fig. 4.9) se estudió al paciente índice con el microarray de LCA y se encontraron dos mutaciones, una mutación en el gen *CRB1* que había heredado de su madre y otra mutación en el gen *RPGRIP1* heredada de su padre.

Inicialmente esta familia podría parecer un caso de digenismo, pero siendo esta hipótesis poco probable, se decidió comenzar con la hipótesis más probable (2ª mutación en el gen *CRB1*) mediante el estudio del gen *CRB1*. Para ello se hizo un estudio familiar de haplotipos y se vio que el *probandus* compartía uno de los haplotipos con dos tíos-abuelos (III:6 y III:7) suyos que también eran afectados. Esto llevó a plantear la hipótesis de tendría que existir otra mutación en el gen *CRB1* que el *probandus* hubiera heredado de su padre y que a su vez compartiera con sus dos tíos-abuelos afectados.

Se estudió el gen *CRB1* completo y se encontró la mutación p.Ile1001Asn en el paciente índice.

Como se había planteado en la hipótesis inicial, ambos tíos-abuelos presentaban esta mutación que iba asociada al haplotipo que compartían con su sobrino nieto. Por lo tanto al presentar una mutación en heterocigosis en *CRB1* lo más probable es que tuvieran otra en el otro alelo que diera lugar a la patología.

Se estudió el gen *CRB1* completo de ambos pacientes y se detectó otra mutación nueva en *CRB1*, la mutación: p.Asp564Thr.

A su vez se estudió otra rama de la familia donde había un varón afecto y que era un primo por partida doble de los tíos-abuelos afectados del *probandus*. Inicialmente, lo esperable era que este paciente presentase las mismas mutaciones que sus primos, ya que, debido al parentesco entre ellos, podrían presentar el mismo haplotipo, pero en cambio no fue así y este último paciente comparte sólo uno de los haplotipos.

En este paciente se secuenció *CRB1* pero no se encontró ninguna mutación en el gen *CRB1*.

En esta familia se encontró también una mutación en el gen *RPGRIP1* que comparten varios miembros de la familia como se puede observar en la figura 4.9, inicialmente se pensó que esta mutación podría ejercer un efecto modificador del fenotipo y por lo tanto se trataría de un caso de trialelismo. En cambio, se observa que esta mutación no cosegrega con la gravedad o con la no gravedad del fenotipo, ya que la presentan el paciente con el fenotipo LCA (el *probandus*) y su tío-abuelo que debutó a los 12 años con la Retinosis Pigmentaria, y en cambio su tía-abuela que debutó con RP con 3 años no presenta este cambio.

CRB1 es un componente central del *scaffold* que controla el ensamblaje de la *zonula adherens* [Pellikka *et al.*, 2002] y *RPGRIP1* es un componente estructural del axonema ciliar [Hong *et al.*, 2001]. No hay descrito nada sobre la interacción entre ambas proteínas, lo que no permite formular un hipótesis sobre su posible efecto de uno sobre otro (Fig. 5.6).

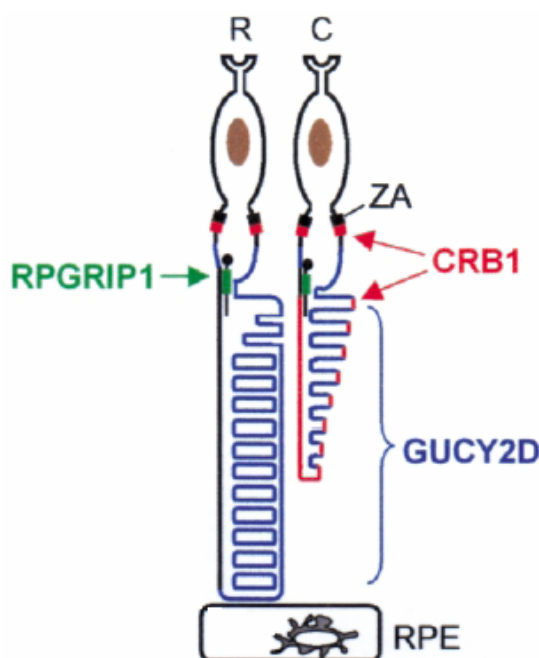


Figura 5.6. Esquema adaptado de Cremers *et al.*, 2002. Localización subcelular de las proteínas codificadas por *CRB1*, *RPGRIP1* y *GUCY2D*. *CRB1* se localiza adyacente a la *zonula adherens* (ZA) de los segmentos internos de los conos (C) y los bastones (R) y en el segmento externo de la membrana plasmática de los conos [Pellikka *et al.*, 2002]. *GUCY2D* se localiza en diferentes células, pero principalmente en la región externa de los conos y en menor grado en los segmentos externos de los bastones [Liu *et al.*, 1994]. *RPGRIP1* se localiza en el axonema ciliar [Zhao *et al.*, 2003].

5.4.2. *CRB1* y *RPGRIP1*: Familia RP-0137

En esta familia (Fig. 4.13) ambos genes quedan descartados, ya que los dos hermanos afectados, los cuales presentan el mismo fenotipo, no comparten los haplotipos para ninguno de los dos genes.

Esta familia pone de manifiesto el hecho de que la presencia de algunas mutaciones encontradas por el microarray LCA se debe al azar, es decir, los pacientes son portadores de esas mutaciones como cualquier individuo tiene cambios en heterocigosis en su genoma que no le causan ninguna patología. En este caso, sería otro gen el que cause la RP y no estos cambios que, como confirma el análisis, no justifican el fenotipo en ambos hermanos.

5.4.3. *CRB1* y *RPGRIP1*: Familia RP-0310

La familia RP-0310 (Fig. 4.12) presenta la mutación p.Ile205Thr en *CRB1* asociada al cambio p.Asp1114Gly en el gen *RPGRIP1* (considerada polimórfica). El digenismo se descarta ya que ambas mutaciones son heredadas de la madre, en cambio el trialelismo puede ser el responsable en esta familia, y que otra mutación (en combinación con éstas) en *CRB1* o en *RPGRIP1* sea la responsable del fenotipo.

5.4.4. *CRB1* y *RPGRIP1*: Familia RP-1017

La familia RP-1017 (Fig. 4.14) presenta una mutación en el gen *CRB1* (p.Thr745Met) y una segunda mutación en el gen *RPGRIP1* (p.Asp1114Gly), que es la considerada como polimórfica o modificadora del fenotipo. En esta familia se descarta el digenismo, ya que una de las mutaciones es uno de los polimorfismos (p.Asp1114Gly) y se ha descartado que cause la patología en sí mismo.

Lo que no se puede descartar es el trialelismo, aunque no se haya detectado la segunda mutación en el gen *CRB1*.

5.4.5. *CRB1* y *GUCY2D*: Familias LCA-0012 y LCA-0042

La mutación p.Ile205Thr, que algunos autores [Booij *et al.*, 2005 y den Hollander *et al.*, 2004] describen como un polimorfismo proteico poco frecuente que no tiene efecto sobre el fenotipo, cosegrega con la enfermedad en la familia LCA-0012 (Fig. 4.10) y que tanto en ella como en la LCA-0042 (Fig. 4.11) va asociada a la mutación p.Pro701Ser en el gen *GUCY2D*.

Al ir asociadas al cambio p.Pro701Ser en el gen *GUCY2D*, mutación considerada polimorfismo o modificadora del fenotipo, pero no una mutación patogénica en sí misma, se descarta el digenismo en ambas familias. Pero no así el trialelismo.

Quizá ambas mutaciones no sean patogénicas en sí mismas pero su combinación con otros cambios en *CRB1* o *GUCY2D* den lugar a la patología.

No existen datos sobre la interacción de ambas proteínas que pueda explicar la posible relación entre ambas mutaciones. Pero hay que destacar que de las 9 familias digénicas/trialelicas 2 de ellas presentan estos cambios. Revisando la literatura no se han detectado otras familias que presenten cambios en estos dos genes simultáneamente.

5.4.6. *CEP290* y *RPGRIP1*: Familias LCA-0037 y LCA-0039

En las familias LCA-0037 (Fig. 4.16) y LCA-0039 (Fig. 4.17), se observa que, además de presentar la mutación p.Cys998ter (*CEP290*) en homocigosis, presentan una tercera mutación en el gen *RPGRIP1*. No siendo ninguna de las dos la mutación

que se ha considerado como frecuente. LCA-0037 presenta la p.Gln589His y LCA-0039 la mutación p.Thr806Ile.

Hay una gran cantidad de proteínas implicadas en la degeneración retinal que están localizadas en el cilio conector. Aunque su función y organización sea, hasta el momento, desconocido, se sabe que la afectación de alguna de estas proteínas da lugar a una gran variedad de fenotipos [Adams *et al.*, 2007]. En el caso que nos ocupa son *RPGRIP1*, *CEP290* y *LCA5* los que dan lugar al fenotipo LCA y se localizan en el cilio conector.

Se ha visto que *CEP290* interacciona con el gen *RPGR*, *RP GTPase regulator* [Chang *et al.*, 2006 y Sayer *et al.*, 2006], este gen se encuentra localizado en el cromosoma X y es responsable del 70% de las XLRP [Roepman *et al.*, 1996 y Meindl *et al.*, 1996]. A su vez, *RPGR* está anclado al cilio conector mediante *RPGRIP1*, cuyo papel parece ser el de componente estructural del axonema ciliar [Hong *et al.*, 2001] (Fig. 5.7). *RPGRIP1* toma parte del complejo proteínico que regula la reorganización del citoesqueleto durante la formación del disco. Esta función es debida a la homología entre el dominio C-terminal de *RPGRIP1* y la proteína *actin-fragmin kinasa* (AFK) que controla la reorganización del citoesqueleto [Zhao *et al.*, 2003 y Koenkoop, 2005].

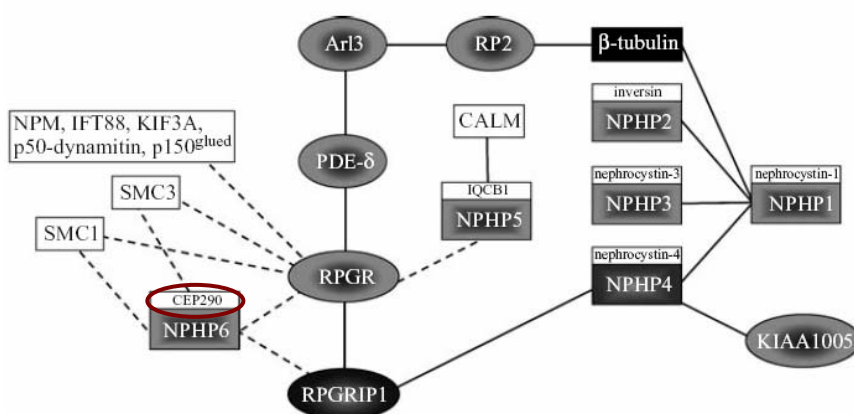


Figura 5.7. Red RPGR-Nephrocystin. Red proteínica óculo-retinal en el cilio conector: interacción *RPGRIP1*-nephrocystin-4. Esquema adaptado del Libro E. Bertrand and M. Faupel (eds.), *Subcellular Proteomics*, 209–235. © 2007 Springer.

En el caso de ambas familias, los afectos presentan tanto las mutaciones en *CEP290* como una mutación en heterocigosis en *RPGRIP1* que puede estar actuando de modificador. En la familia LCA-0037 ambos hermanos afectados presentan el cambio en *RPGRIP1* y tienen el mismo fenotipo. La correlación genotipo-fenotipo en *CEP290* se discutirá en el apartado 5.8.2.

5.4.7. *CRX* y *RPGRIP1*: Familia RP-0997

Tras observar en la familia RP-0977 (Fig. 4.20) que la mutación en *CRX* es heredada, se ha observado que va acompañada de otra en el gen *RPGRIP1*. Inicialmente, no se puede excluir que sea un caso de digenismo al heredarse biparentalmente, aunque se descarta por tratarse de la mutación frecuente considerada como polimorfismo. Por lo tanto, se trata probablemente de un caso de trialelismo.



En todas nuestras familias se ha descartado el digenismo puro pero no así el trialelismo, otros autores han detectado familias con posible digenismo o trialelismo, ninguno de los casos coinciden con las mutaciones que se han detectado en este estudio.

En el gen *AIPL1* no se han encontrado familias digénicas o trialélicas en este estudio, en cambio, en la literatura [Zernant *et al.*, 2005] hay descritos dos casos de posible trialelismo para este gen, uno con la mutación en *AIPL1* (p.Gln163ter) en homocigosis, que puede interaccionar con *CRX* (p.Thr273Leu en heterocigosis) y otra familia que presenta una la mutación p.Arg302Leu en *AIPL1* en homocigosis y otra en el gen *CRB1* (p.Arg1331His en heterocigosis). En las familias trialélicas/digénicas presentadas en este trabajo no se producen estas combinaciones.

Tampoco se han detectado familias digénicas/trialélicas con mutaciones en *GUCY2D*, en cambio Zernant *et al.* [2005], en un estudio llevado a cabo mediante el uso del microarray LCA observan que en 2 de sus familias hay posible trialelismo y el gen implicado es *GUCY2D*.

Una de las familias es consanguínea y de origen Suizo asentada en Pensilvania y perteneciente al grupo “*Old Order River Brethren*” donde se ha identificado un *locus* (6q14) que es el responsable de la enfermedad y a su vez, con el microarray de LCA se ha detectado la mutación p.Pro701Ser en *GUCY2D*. En el caso de esta familia los autores observan que el fenotipo de los afectados que presentan esta mutación es más grave que el de aquellos que no la tienen. Dos años más tarde, den Hollander *et al.*, [2007] clonaron el gen *LCA5* localizado en 6q14, lo que hace que, es posible que esta familia presente trialelismo de mutaciones en el gen *LCA5* en homocigosis y la mutación p.Pro701Ser en *GUCY2D*.

En la otra familia también consanguínea, sucede lo mismo, el afecto que presenta el tercer alelo tiene un fenotipo más agresivo que sus hermanos quienes no lo presentan, siendo las combinaciones las siguientes: *RPE65* (p.Glu102ter en homocigosis) y *GUCY2D* (p.Ile573Val en heterocigosis) [Zernant *et al.*, 2005].

5.5. Familias caracterizadas en LCA y RP-IP

Gracias al uso del microarray y el trabajo de cribado en el laboratorio se ha detectado al menos una mutación en el 34,7% de las familias de LCA y un 14,8% de las familias RP-IP. Si se observa el número de alelos mutantes detectados en LCA es del 27,6%, lógicamente, es menor que el número de familias ya que a menudo se detecta 1 mutación por familia. En el caso de alelos mutados en RP-IP es el 8,2%.

Los resultados obtenidos en los pacientes en LCA y RP-IP indican principalmente dos cosas, por un lado, ha servido para confirmar que la herramienta está bien diseñada para el análisis de pacientes con LCA y tiene una eficiencia menor para pacientes con RP-IP como era lo esperado. Por otro lado también indica que las familias están bien clasificadas fenotípicamente en nuestro estudio. Este punto es crucial a la hora de hacer un diseño correcto para un estudio en pacientes. El trabajo combinado entre los oftalmólogos, los clínicos y el laboratorio lleva a aumentar la eficiencia del estudio. Por ello hay que recalcar la importancia de la clasificación de los pacientes a nivel de fenotipo antes de comenzar con el estudio genotípico.

Si se tienen en cuenta las familias consanguíneas y las endogámicas (Fig. 4.2 y 4.3, respectivamente) el porcentaje en ambos grupos es muy elevado. En el caso de las familias LCA alcanza un 25% de las familias estudiadas, que es la misma proporción que detectó Theodor Leber en 1869 respecto a los padres de los niños de una guardería de invidentes. Este motivo fue el que le llevó a pensar que quizá la enfermedad fuera genética. En el caso de las RP-IP más de un 43% de las familias presentan endogamia o consanguinidad.

Tras el análisis completo de los resultados (Fig. 4.23), se ha realizado un análisis estadístico para saber si hay diferencias a la hora de detectar la mutación en base a la consanguinidad/endogamia de la familia estudiada. El análisis ha puesto de manifiesto que no hay diferencias a la hora de encontrar mutaciones dependiendo de la existencia o no de parentesco entre los padres de los pacientes.

En el caso de la figura 4.22 hay que señalar que representa el número de familias con mutaciones patogénicas detectadas (sin tener en cuenta los polimorfismos)

divididas en base a las familias con dos mutaciones detectadas y por tanto caracterizadas completamente (marcadas en color burdeos) y las familias donde se ha detectado una sola mutación, ya sea porque no estaba en la zona codificante o por no haber realizado el estudio exhaustivo del gen (marcadas en gris).

Este análisis confirma que con el estudio combinado de microarray LCA y cribado en el laboratorio se pueden diagnosticar un gran número de casos. A su vez, hay otras familias donde sólo se ha detectado un cambio y no se ha podido afirmar con certeza que sea ese gen el responsable de la patología. Por ello, aunque la capacidad de detección sea alta para lo que se conseguía hace unos años (alta sensibilidad), hay un alto número de resultados no concluyentes (menor especificidad) en los que no es posible ofrecer un asesoramiento genético completo (pronóstico, diagnóstico prenatal o pre-implantacional, entre otros).

Esto lleva a plantearse en qué medida influyen las nuevas tecnologías en el diagnóstico genético. Las nuevas herramientas que están surgiendo actualmente para el diagnóstico molecular superan con creces las que existían hace tan solo unos pocos años. Estas herramientas, que generalmente se presentan en forma de microarray, ya sean de genotipado o de variación en el número de copias, proporcionan una cantidad de información tal, que hace que la interpretación de los resultados sea cada vez más compleja. Por lo que su aplicación clínica requiere cautela y análisis adicionales (estudio familiar, estudio en controles, análisis comparativo de proteínas, entre otros).

El microarray de Asperbio, que se ha empleado en esta tesis doctoral como herramienta para el cribado inicial de todas las familias, ha demostrado ser muy eficiente, ya que detecta 1 cambio/mutación en 1 de cada 3 familias. El problema viene a la hora de la interpretación, ¿cuántas de estas mutaciones son verdaderamente las responsables del fenotipo en la familia? Hay casos donde no se encuentra una segunda mutación y no se puede, por lo tanto, confirmar el problema genético que causa el fenotipo.

Debido a esto hay que recalcar la importancia de un estudio exhaustivo en todas las familias tras el cribado con el microarray, ya que el estudiar un espectro tan

amplio de mutaciones se pueden encontrar cambios/mutaciones que sean por puro azar, es decir, esa mutación está en la familia en heterocigosis, como lo están tantas otras de enfermedades de herencia autosómica recesiva en la población.

Uno de los problemas fundamentales que, por tanto, presentan estas herramientas es que son capaces de analizar diversa información genética (genotipos, número de copias, entre otras) pero a la hora de interpretar se tienen aún recursos limitados, además, la cantidad de datos es tan grande que es necesario la ayuda de la informática para poder comprenderlos y aún en los casos donde hay programas que analizan los resultados, no hay suficientes datos previos de otros pacientes como para sacar conclusiones de las comparaciones.

En el caso del microarray LCA de Asperbio, este trabajo ha demostrado que no todos los cambios que en principio parecían mutaciones, causaban finalmente el fenotipo. Seguramente entre las familias con una mutación y donde tras el estudio completo del gen no se ha encontrado la segunda mutación haya dos tipos: unas donde (al no haber secuenciado otras regiones como las intrónicas) puede que la segunda mutación exista pero no se haya detectado y otras que presenten ese cambio por azar en heterocigosis y que por tanto no afecte al fenotipo, siendo otro gen el responsable.

Un análisis global y exhaustivo de toda la información general disponible, junto con el estudio familiar es imprescindible antes de dar un asesoramiento genético en estas familias.

5.6. Espectro de genes responsables de LCA y RP-IP en población española

La figura 5.8 muestra las proporciones estimadas en pacientes con LCA en un estudio reciente [Sweeney *et al.*, 2007].

Para comparar estos datos con población española se ha realizado un análisis *chi-cuadrado* y se ha llegado a la conclusión de que los genes *RPGRIP1*, *RDH12* y *AIPL1* tienen una proporción similar en población española y el resto del mundo. En cambio para los genes *CRB1*, *CEP290*, *GUCY2D*, *RPE65*, *CRX*, *TULP1* y *LRAT* el resultado de análisis ha revelado que las proporciones en nuestra población son diferentes a las detectadas en otros lugares.

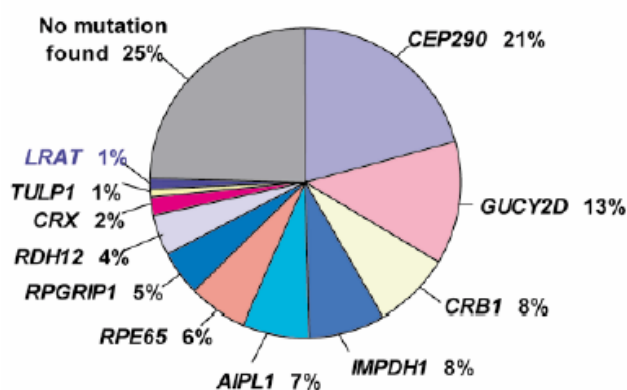


Figura 5.8. Esquema adaptado de Sweeney *et al.*, [2007]. Proporciones estimadas en pacientes con LCA causadas por los 11 genes descritos hasta el momento implicados en la patología (no se incluyen ni *LCA5* ni *RD3*). Según los autores, estos 11 genes son responsables del 75% de la LCA.

En el caso del estudio de *IMPDH1*, que no se ha llevado a cabo en esta tesis doctoral, la proporción calculada en el artículo no es muy acertada, ya que de los demás genes hay varios estudios y de éstos se ha hecho una media, en cambio para *IMPDH1* se ha tenido en cuenta sólo un estudio [Bowne *et al.*, 2006] llevado a cabo en 24 pacientes donde 2 de ellos presentaban mutaciones en este gen, y esto es lo que hace que represente un 8% en la figura 5.8.

Por lo tanto, a excepción de *IMPDH1* que no se considera un resultado muy fiable, se puede decir que la población española tiene un espectro mutacional muy diferente a otras poblaciones y por lo tanto es fundamental el análisis dirigido en

nuestros pacientes para comenzar los estudios por los genes que están más mutados en nuestra población.

A su vez se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica de estudios realizados en familias LCA de los siete genes que aparecen mutados en nuestro estudio (Tabla 5.2).

Hay varios autores que sostienen que los 13 genes detectados hasta el momento implicados en LCA justifican de un 60 a un 75% de la patología [Koenekoop *et al.*, 2007 y Sweeney *et al.*, 2007], en cambio en nuestro caso este porcentaje de detección es del 34,7%. Es muy posible que este resultado no sea aplicable a una población en concreto, ya que estos estudios calculan este dato haciendo una recopilación de la literatura con todos los pacientes estudiados en diferentes poblaciones, lo cual no es extrapolable a cada una de las poblaciones en particular. Por lo tanto es posible que este resultado dependa de la composición genética de las poblaciones estudiadas.

Aunque, bien es verdad que, en nuestro estudio no se han incluido los genes *IMPDH1*, *TULP1*, *RD3* y *LCA5*.

En un estudio reciente hecho en población italiana [Simonelli *et al.*, 2007], detectaron mutaciones en un 28% de los pacientes con LCA analizados mediante la técnica de microarray de Asperbio y la combinación del trabajo de laboratorio.

Otro estudio de Yzer *et al.*, [2006] hecho en población del noroeste de Europa, mediante el uso del microarray de LCA, detectan mutaciones en el 33% de las familias estudiadas (Tabla 5.2). A su vez, el primer estudio realizado con esta herramienta [Zernant *et al.*, 2005], detectó mutaciones en un 34% de los pacientes de origen holandés, en un 31% de pacientes de origen canadiense y en un 35% de los pacientes de EEUU (Tabla 5.2).

Por lo tanto, nuestro estudio, con un 35% de detección de mutaciones en familias LCA, está dentro de este rango. Por lo que el empleo del microarray LCA y combinado con el trabajo del laboratorio, detecta 1 familia mutada de cada 3 estudiadas con este fenotipo. Aunque hay que considerar que en nuestro estudio se

han eliminado los tres polimorfismos que eran considerados mutaciones por el microarray LCA, por lo tanto, la tasa de detección de nuestro estudio ha sido más alta que la del resto de los trabajos realizados con el microarray, ya que en sus trabajos se incluyen estos tres cambios.

En la tabla 5.2, donde se representan únicamente los genes estudiados en este trabajo, se observa en los porcentajes de familias caracterizadas, que los trabajos con mayor eficacia son los que han empleado el microarray. Sólo hay un trabajo que detecta mutaciones en un 46% de los pacientes [Hanein *et al.*, 2004] y es porque ha estudiado todos los genes (exceptuando *CEP290* y *RDH12*) mediante secuenciación automática.

Esto pone de manifiesto que el microarray es limitado en la medida que sólo estudia las mutaciones descritas hasta el momento, y por lo tanto no detectará mutaciones presentes en la familia que no estén previamente añadidas en la herramienta.

Por ello, el abordaje más largo pero con una mayor tasa de detección es la de la secuenciación automática, cuyos inconvenientes son el tiempo empleado en su realización y el coste del mismo. Por ello una combinación de ambos elementos (microarray y métodos de cribado y secuenciación automática) es la forma de obtener un mejor coste/beneficio, así como dar un diagnóstico en el menor tiempo posible al paciente.

Ya se ha visto, que al estudiar cada uno de los genes de forma individual, la implicación de los mismos en pacientes LCA de origen español es muy diferente a la de otras poblaciones. Este es el caso de *CRB1* que en nuestro estudio es el que tiene la mayor tasa de mutación, y en cambio otros genes como *GUCY2D* no se ha detectado en pacientes LCA, mientras que en otros grupos (que no incluyen pacientes españoles) es el más mutado con diferencia [ver tabla 5.2: Perrault *et al.*, 2000; Hanein *et al.*, 2004 y Zernant *et al.*, 2005].

	Método	<i>AIPL1</i>	<i>CEP290</i>	<i>CRB1</i>	<i>CRX</i>	<i>GUCY2D</i>	<i>RDH12</i>	<i>RPE65</i>	<i>RPGRIP1</i>	N	%
Dharmaraj <i>et al.</i> , 2000	SSCP				2 (2%)	6 (6%)		3 (3%)		100	11%
Sohocki <i>et al.</i> , 2000	SSCP	11 (6%)								188	6%
Lotery <i>et al.</i> , 2000	SSCP				5 (3%)	11 (6%)		12 (7%)		176	16%
Perrault <i>et al.</i> , 2000	Secuenciación					24 (20%)				118	20%
Thompson <i>et al.</i> , 2000	SSCP							13 (11%)		114	11%
Marcos <i>et al.</i> , 2001 ⁵	Ligamiento + secuenciación							0 (0%)		72	0%
Gerber <i>et al.</i> , 2001	Ligamiento + secuenciación								8 (6%)	142	6%
Simovich <i>et al.</i> , 2001	SSCP							8 (8%)		98	8%
Hanein <i>et al.</i> , 2004	Secuenciación	6 (3%)		18 (10%)	1 (1%)	38 (21%)		11 (6%)	8 (4%)	179	46%
Dharmaraj <i>et al.</i> , 2004	SSCP	26 (9%)								303	9%
Perrault <i>et al.</i> , 2004	Secuenciación						8 (4%)			179	4%
Zernant <i>et al.</i> , 2005 ¹	Array LCA	8 (20%)		0 (0%)	0 (0%)	4 (10%)		0 (0%)	2 (5%)	41	34%
Zernant <i>et al.</i> , 2005 ²	Array LCA	4 (7%)		2 (3%)	1 (2%)	8 (14%)		1 (2%)	2 (3%)	59	31%
Zernant <i>et al.</i> , 2005 ³	Array LCA	4 (4%)		9 (9%)	2 (2%)	12 (11%)		4 (4%)	6 (6%)	105	35%
Yzer <i>et al.</i> , 2006 ⁴	Array LCA	3 (5%)		9 (16%)	0 (0%)	6 (10%)	0 (0%)	1 (2%)	0 (0%)	58	33%
Perrault <i>et al.</i> , 2007	dHPLC		21 (22%)							96	22%
Simonelli <i>et al.</i> , 2007 ⁵	Array LCA	3 (3%)	4 (4%)	7 (7%)	0 (0%)	5 (5%)	0 (0%)	8 (8%)	0 (0%)	95	28%
Este estudio, 2007 ⁶	Array LCA	1 (2%)	4 (8%)	10 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (2%)	0 (0%)	1 (2%)	49	35%

Tabla 5.2. Resultados obtenidos en diferentes estudios de pacientes LCA. En algunos casos es posible indicar la población de origen de los pacientes, en cambio, en otros de los estudios el origen es tan variado que no es posible relacionar los resultados obtenidos con las diferentes poblaciones. Siendo ¹– Holanda ²–Canadá ³–EEUU ⁴–Noroeste de Europa ⁵–Italia y ⁶–España. En los casos donde se ha llevado a cabo el estudio de un gen y no se ha detectado ninguna mutación se representa como 0% de mutados.

Hay otros genes que tampoco presentan mutaciones en población española como es el caso de *RPE56*. Este gen tiene una importancia especial, ya que ha sido el primero de los implicados en LCA donde se han empezado los ensayos clínicos para una posible terapia génica [Acland *et al.*, 2001]. Mientras que en otras poblaciones, como la italiana que son similares a la nuestra, se detectan hasta un 8,4% de casos [Simonelli *et al.*, 2007] en nuestro estudio no hay ninguna familia mutada en *RPE65*. Por tanto, para nuestros pacientes, será necesario diseñar ensayos clínicos para otros genes, aprovechando el conocimiento adquirido gracias a *RPE65*.

Es muy importante el conocer el espectro mutacional de nuestra población, ya que a la hora de tener que secuenciar genes, hay que empezar por los que tengan una mayor tasa de mutación en nuestros pacientes. En el caso que nos ocupa es el gen *CRB1* el que tiene una mayor tasa de mutación en pacientes LCA, siendo la prevalencia de portadores en población española 1 de cada 3130 individuos. Esto justifica la alta prevalencia de pacientes con mutaciones en este gen.

A continuación se hará un repaso de todas las situaciones en las que se ha visto implicado *CRB1* en este estudio para ilustrar el amplio rango de actuación del mismo.

Familias con 2 mutaciones patogénicas: se ha visto que hay familias que presentan una mutación en y la mayor parte de las familias estudiadas presentan dos mutaciones en heterocigosis, es decir son heterocigotos compuestos y esto es lo que causa el fenotipo LCA.

Familias con mutaciones encontradas por azar: también se ha detectado en una familia (RP-0137) donde la mutación no cosegrega con la enfermedad, es decir, la mutación aparece por azar, no es *CRB1* el causante de la patología en esta familia. Esto indica que a pesar de ser un gen con una alta frecuencia de mutación en LCA y RP-IP, hay ocasiones donde puede estar mutado y no ser el responsable de la patología.

Familias con mutaciones en *CRB1* que no se tiene claro su papel patogénico y pueden ir asociadas a trialelismo: la mutación (p.Ile205Thr) que no se ha podido establecer si tiene un papel patogénico o no. Esta mutación aparece junto a mutaciones en *RPGRIP1* y *GUCY2D* y no se puede descartar que sean factores modificadores que finalmente den lugar al fenotipo.

Familias donde se ha descartado digenismo y trialelismo: en la familia LCA-0038 se ha visto que, aunque las mutaciones en *CRB1* vayan acompañadas de una mutación *RPGRIP1* (p.Gln589His), no se produce ningún efecto de digenismo o trialelismo. Por lo que también estas asociaciones pueden ser fortuitas y no afectar al fenotipo del paciente. Aunque sólo lo podemos afirmar para las mutaciones encontradas en esta familia y no es extrapolable a otras donde los cambios en el ADN pueden ser distintos. En estos casos es imprescindible el estudio completo de la familia, tanto de afectos como de sanos.

Familias donde se ha descartado el digenismo pero no el trialelismo: por último no se puede descartar un posible trialelismo entre *CRB1* (p.Thr745Met) y *RPGRIP1* (p.Asp1114Gly).

En todas las familias estudiadas se ha descartado el digenismo puro (Tabla 5.1).

Sería necesario estudiar más casos para poder establecer si realmente son fenómenos de trialelismo entre *CRB1* y *RPGRIP1* (p.Asp1114Gly) y entre *CRB1* y *GUCY2D* (p.Pro701Ser), ya que ambos casos van asociados a los polimorfismos detectados en esos genes.

Por lo tanto, se ha visto que *CRB1* puede verse implicado en diferentes modos de herencia y que puede jugar un papel importante en diferentes situaciones. En el apartado 5.8.1 se discutirá sobre el fenotipo de estos pacientes, pero se puede adelantar que con este espectro mutacional tan amplio es muy difícil establecer una correlación genotipo-fenotipo en estos pacientes.

5.7. Distribución geográfica

En la figura 4.25 se observa que hay una distribución homogénea en las familias LCA. Las familias RP-IP (Fig. 4.26) se distribuyen por toda España exceptuando Cataluña y Aragón, donde el número de familias es tan bajo que para las siguientes estadísticas no se contemplarán como comunidades estudiadas.

5.7.1. Familias con mutaciones en *CRB1*

En este estudio se ha visto que la frecuencia de *CRB1* en pacientes con LCA es muy superior a la de otras poblaciones, siendo de un 20,41%. También se ha detectado en familias con RP-IP en un 6,25% de las mismas. Las mutaciones en *CRB1* suponen de un 0 a un 15,5% de los casos de LCA [Zernant *et al.*, 2005 y Yzer *et al.*, 2006] a excepción de España donde este porcentaje alcanza el 20,41% (Fig. 4.27). Las poblaciones que más se acercan a España son la belga y la holandesa con un 15,5% de pacientes LCA causados por mutaciones en *CRB1*. En cambio, las poblaciones más cercanas a España como pueden ser Portugal, Francia, Italia y el norte de África tienen una proporción que es menor de la mitad que en España.

Si se tiene en cuenta el espectro mutacional de *CRB1* en población LCA española, se observa que hay una mutación (p.Cys948Tyr) que es más frecuente que las demás, pero esto, como se ha visto anteriormente, sucede en toda Europa. Por lo tanto, sabiendo que la proporción de esta mutación es igual en otras poblaciones hay que detenerse en el resto de mutaciones y analizar si hay alguna otra que sea más prevalente o incluso exclusiva de población española. Pero entre el resto de las mutaciones de *CRB1* no destaca ninguna particularmente y hay un espectro mutacional muy amplio. Este dato contrasta con el hecho de que la prevalencia es más alta que en otras poblaciones, ya que lo esperado hubiera sido encontrar una mutación prevalente en población española que justificara el alto porcentaje.

Si se observa el mapa de distribución de familias con mutaciones en el gen *CRB1* con detalle (Fig. 4.27), destaca que Castilla y León presenta una mayor densidad que el resto de España. Esta diferencia ha sido confirmada mediante un

test *chi*-cuadrado con los datos de población del Instituto Español de Estadística (www.ine.es). Hay que destacar que en este estudio no hay prácticamente pacientes pertenecientes a Cataluña y Aragón y pocos en Galicia, como se puede observar en las figuras 4.25 y 4.26.

Inicialmente, esta alta prevalencia del gen *CRB1* mutado en Castilla y León hacía pensar que sería fruto de un efecto fundador de una mutación común. Al analizar el espectro mutacional se observó que estas familias no eran las que presentan la mutación común (p.Cys948Tyr) como puede observarse en la figura 4.31. Por lo tanto, se llegó a la conclusión, de que en Castilla y León se produce una concentración inusual de alelos mutados en el gen *CRB1* con un espectro muy amplio de mutaciones. El motivo que puede dar lugar a este fenómeno es desconocido aunque se pueden plantear diferentes hipótesis:

Hipótesis 1: La selección fenotípica de pacientes LCA en España favorece de alguna forma el fenotipo asociado a *CRB1*, es decir, quizá pacientes con otros fenotipos no sean considerados LCA sino dentro de otro grupo clínico.

Hipótesis 2: Que los portadores de mutaciones en *CRB1* tengan alguna ventaja adaptativa, es decir, que haya algún tipo de selección positiva para portadores de mutaciones en *CRB1* en nuestra población. Esta hipótesis no parece muy factible ya que en otras poblaciones similares a la española (portuguesa e italiana) el porcentaje de *CRB1* es mucho más bajo y son los países mediterráneos más parecidos a España respecto a clima, cultura y alimentación entre otros. Quizá favorezca alguna característica de nuestra población que no comparta con otras.

Hipótesis 3: Una explicación histórica sobre las migraciones en la península, especialmente en la zona de Castilla y León. En el caso de esta región, hay dos hechos históricos que pueden avalar esta teoría.

El primero es el paso del Camino de Santiago, en concreto la “Vía Francesa” que era y sigue siendo, la más transitada y la más promocionada, entra en España por Roncesvalles y Somport, en los Pirineos y atraviesa las comunidades autónomas de Aragón, Navarra, La Rioja, Castilla y León y Galicia. Según el *Codex Calixtinus*

(Biblia medieval del culto a Santiago y la peregrinación) el Apóstol Santiago “*devolvía la vista a los ciegos, el andar a los cojos, el oído a los sordos, el habla a los mudos, la vida a los muertos, de toda clase de enfermedades curaba a las gentes*”. Todo ello confluyó para que los ciegos en fechas muy tempranas se sumasen a la gran romería santiaguesa: unas veces, como piadosos peregrinos en busca de la curación y otras, enrolados en el fabuloso mundo de la juglaría andariega [VV.AA., 2004].

Este peregrinaje constante desde el siglo X ha sido probablemente una entrada continua de variantes genéticas en la península que se concentra principalmente en el norte. Si se tiene en cuenta que la población del camino de Santiago no es una población tomada al azar, sino que el número de personas ciegas es más alto de lo esperado, es posible que el paso durante tantos siglos haya hecho que el espectro mutacional de la zona sea tan variado y tan extenso.

Hay quizá otra explicación histórica de esta variabilidad que puede estar, además, relacionada con la similitud respecto a Bélgica y Holanda en el porcentaje de alelos mutados en *CRB1* (Fig. 5.9). En 1520 Carlos I de España y V de Alemania reúne bajo un solo cetro los reinos españoles de Castilla y Aragón, más los dominios italiano y europeos de los Habsburgo y es nombrado emperador del Sacro Imperio Romano-Germánico. Carlos I llega a España desde Gante (Bélgica) acompañado por tres escuadras de Holanda, Zelanda y España, en conjunto 40 naves gruesas y 12 naves menores. Según el liberal Modesto Lafuente en su Historia General de España [1850-1867] “*España fue arruinada por los soberanos extranjeros y sometida al absolutismo extranjero*”. La presencia de numerosos extranjeros como miembros de la corte real y como funcionarios, originó el violento rechazo por parte de la población de Castilla.

Este hecho histórico pudo contribuir a la entrada de mutaciones pertenecientes a Bélgica y Holanda, lo que podría explicar que el porcentaje de mutaciones en *CRB1* en población española sea parecido al de Bélgica y Holanda (el análisis estadístico confirma que no hay diferencias significativas entre estas poblaciones), ver figura 5.9.

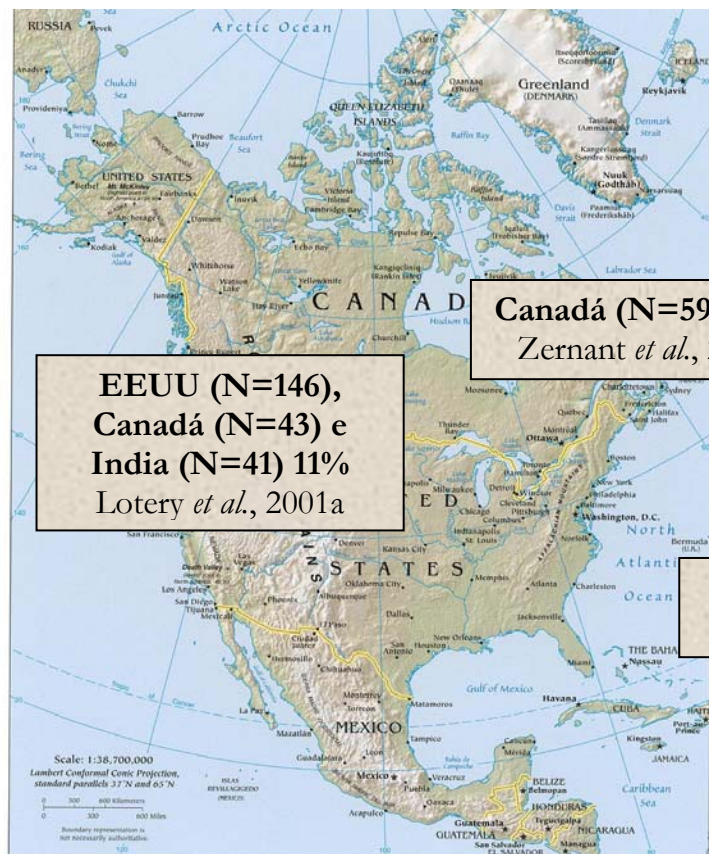
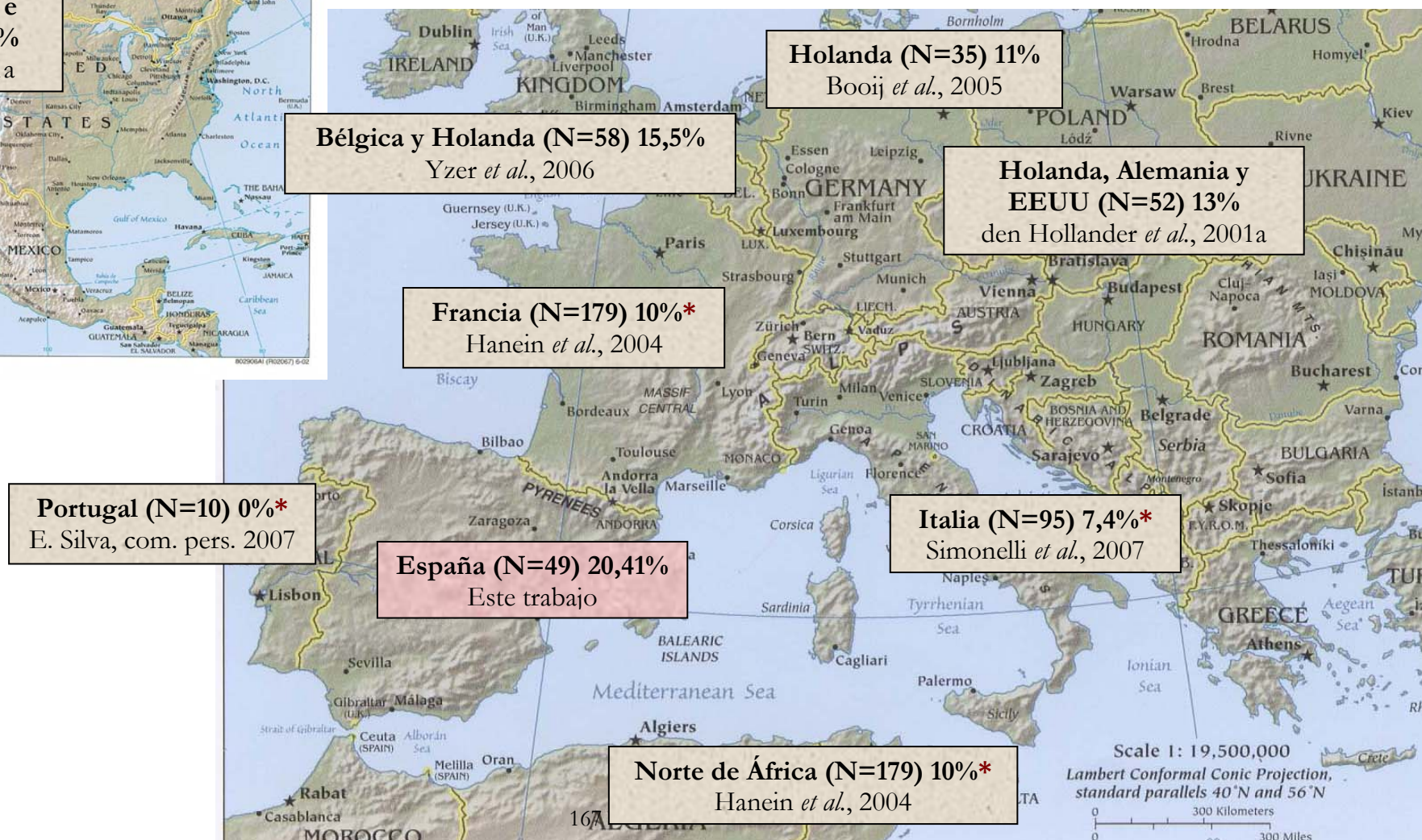


Figura 5.9. Porcentaje de la implicación de *CRB1* en diferentes países en pacientes con fenotipo LCA. El dato representado en la figura es el tanto por ciento de pacientes afectados de LCA que presentan mutaciones en este gen.

N: Número de familias estudiadas.

*: Diferencias significativas con España ($p>0,05$).



5.7.2. Cambio p.Asp1114Gly (*RPGRIP1*)

Este cambio es uno de los considerados polimorfismos, aún así de todas formas se ha querido ver si tiene un origen común. Para ello se ha realizado el mapa de la distribución de las familias que presentan ese cambio (Fig. 4.28) y el análisis mediante haplotipos (incluyendo microsatélites y SNPs).

El análisis conjunto de los datos muestra un origen común de la mutación, es decir, muy probablemente todos los pacientes que presentan este cambio son descendientes de un ancestro común. Además los haplotipos indican diferentes agrupaciones ya que ha ido cambiando a lo largo del tiempo, pero entre ellos tienen una parte común, el polimorfismo c.3097G>C es siempre una Guanina.

El grupo formado por las familias LCA-0034, RP-0977 y RP-0544, de las cuales dos de ellas (LCA-0034 y RP-0977) son del archipiélago Canario, indica que posiblemente hubo una migración de la península a las islas llevando consigo el cambio p.Asp1114Gly en el gen *RPGRIP1*.

5.7.3. Mutación p.Cys948Tyr (*CRB1*)

La distribución de esta mutación en el mapa de la figura 4.31, muestra que está repartida por toda España. Esta información junto al resultado del árbol (Fig. 4.33) se puede pensar que es una mutación de origen común en nuestra población pero cuyo origen es muy antiguo. También hay que destacar que los marcadores microsatélites elegidos no son los idóneos, sería más adecuado hacer un estudio con SNPs intragénicos de *CRB1* y así confirmar esta hipótesis.

5.8. Correlación genotipo-fenotipo

5.8.1. Gen *CRB1*

Familia	Mutación 1		Mutación 2	
	Cambio	Conservado evolutivamente	Cambio	Conservado evolutivamente
LCA-0010	c.478-481insG	FS	c.478-481insG	FS
LCA-0019	c.611delAAATAGG	FS	c.2227delG*	FS
LCA-0038 (III:6)	p.Asp564Thr*	Si	p.Ile1001Asn*	Si
LCA-0004	p.Cys896ter	Si	p.Cys948Tyr	Si
LCA-0038 (V:1)	p.Cys896ter	Si	p.Ile1001Asn*	Si
LCA-0011	p.Cys948Tyr	Si	c.2244-47delATC	del 1 aa
LCA-0027	p.Cys948Tyr	Si	p.Glu1330ter*	No
LCA-0028	p.Cys948Tyr	Si	p.Ile1100Thr	No
LCA-0032	p.Cys948Tyr	Si	p.Leu535Pro*	Si
RP-0280	p.Cys948Tyr	Si	p.Trp822ter	No
RP-0025	p.Ile1100Thr	No	p.Ile1100Thr	No

Tabla 5.3. Mutaciones detectadas en nuestros pacientes, así como el grado de conservación del aminoácido a lo largo de la evolución en vertebrados. * - Mutaciones nuevas encontradas

En los pacientes con mutaciones en *CRB1* se han detectado un amplio rango de agudeza visual (AV) [Galvin *et al.*, 2005; Lotery *et al.*, 2001b; Simonelli *et al.*, 2007; Hanein *et al.*, 2004 y Yzer *et al.*, 2006]. En el caso de nuestros pacientes la familia LCA-11 presenta una AV mejor que el resto, siendo las mutaciones asociadas al fenotipo p.Cys948Tyr y c.2244-47delATC. La mutación p.Cys948Tyr está asociada a fenotipos graves [den Hollander *et al.*, 2001b], en cambio la segunda mutación, es la delección de un triplete ATC, que no altera el marco de lectura en la proteína, provoca únicamente la delección de una Serina que, aunque es importante para la función de *CRB1*, hace que el fenotipo no sea tan grave como la asociación de otras mutaciones, al menos la AV.

No se ha podido hacer ninguna asociación entre las mutaciones encontradas la presencia o ausencia de fotofobia en los pacientes, tampoco otros autores han podido establecer una relación [Galvin *et al.*, 2005; Simonelli *et al.*, 2007 y Yzer *et al.*, 2006].

Aunque el número de pacientes estudiados es pequeño y los hallazgos clínicos pueden variar, se ha observado algunos fenotipos constantes que coinciden con los hallazgos hechos en otros estudios como hipermetropía, maculopatía y un patrón con pequeños puntos blancos mezclados con una retinopatía en sal y pimienta y pigmentación numular o en espículas repartida por todo el fondo de ojo.

La hipermetropía ha sido una constante en los pacientes con mutaciones en *CRB1* al igual que en otros estudios [Lotery *et al.*, 2001b; Galvin *et al.*, 2005; Hanein *et al.*, 2004 y Yzer *et al.*, 2006].

En todas nuestras familias se ha observado maculopatía, en la única que no hay alteración en la mácula es la LCA-0004, pero esto es debido a la edad de exploración del paciente (1 año). Se ha observado una maculopatía de inicio precoz como una característica constante en nuestros pacientes.

Se detectaron puntos blancos en el fondo de ojo (FO) en 8 de los pacientes, aunque en la literatura el hallazgo más constante es el de hiperpigmentación numular [Lotery *et al.*, 2001b; Yzer *et al.*, 2006 y Galvin *et al.*, 2005].

La característica principal observada en nuestro estudio ha sido que el patrón observado en el FO es muy variable, otros estudios corroboran este hallazgo [den Hollander *et al.*, 2001a; Lotery *et al.*, 2001b; Simonelli *et al.*, 2007; Yzer *et al.*, 2006 y Galvin *et al.*, 2005].

A su vez en 3 de los pacientes se observó un fenotipo de epitelio paraarteriolar preservado (PPRPE) que se aprecia claramente en la figura 4.35. Este fenotipo fue descrito por Heckenlively en 1982 que es característico de RP12, en el caso de nuestros pacientes va asociado a mutaciones diferentes (Tabla 4.18) y no existe una correlación fenotipo-genotipo.

Lo más destacado de nuestras familias con mutaciones en *CRB1* es el hecho de que no hay dos familias con las mismas mutaciones (Tabla 4.18 y 5.3). Sólo hay una familia que presente una mutación en homocigosis (LCA-0010) y el resto son heterocigotos compuestos para diferentes mutaciones. Esto complica el poder establecer una relación genotipo-fenotipo en nuestros pacientes. Otros autores [den Hollander *et al.*, 2006] tampoco encuentran una correlación genotipo-fenotipo para los pacientes LCA con mutaciones en *CRB1*.

Tras los resultados obtenidos en este estudio respecto al espectro mutacional de pacientes afectados de LCA o RP-IP, se ha visto que son varias las mutaciones que pueden estar presentes en un mismo individuo.

Por lo tanto es fundamental en este tipo de genes la influencia de otros factores genéticos así como factores ambientales que son los que finalmente causarán el fenotipo.

5.8.2. Gen *CEP290*

En las 4 familias donde se ha detectado la mutación p.Cys998ter tienen un fenotipo LCA y en ningún caso se ha detectado en familias con RP-IP. La única familia con un fenotipo RP-IP tiene una mutación distinta (p.Lys1575ter) (Tabla 4.19).

En el caso de las familias LCA-0037 y LCA-0039 van asociadas a otra mutación en el gen *RPGRIP1*, en cambio no parece que haya ninguna característica fenotípica más o menos grave respecto a los otros pacientes con esta mutación. El fenotipo de estas dos familias no difiere del observado en las familias LCA, por ello no se puede saber si hay o no trialelismo en estas dos familias.

En estas familias todos los pacientes presentan las características típicas de la LCA, otros autores en cambio presentan esta mutación en pacientes con una edad de inicio en la segunda década de vida [Perrault *et al.*, 2007]. Y no encuentran una correlación entre genotipo-fenotipo [Perrault *et al.*, 2007].

5.8.3. Gen *RDH12*

Janecke *et al.*, 2004 describen un paciente que es un heterocigoto compuesto, siendo una de las mutaciones la p.Thr49Met que presenta la familia RP-184sub3 en homocigosis. El paciente del artículo presenta ceguera nocturna a los 2 años de vida y nistagmo. En el fondo de ojo tiene una atrofia difusa con pigmentación en espículas y escotoma central. A su vez el ERG fotópico está abolido y el escotópico muy reducido. El paciente de la familia RP-0184_3 presentan un FO alterado a excepción de las áreas maculares y un ERG subnormal (Tabla 4.20).

El otro paciente perteneciente a la familia LCA-0020 presenta, en cambio, el ERG abolido en ambos ojos, y la alteración de todo el fondo de ojo.

Es posible que la mutación p.Thr49Met vaya asociada a un fenotipo ligeramente menos grave que el asociado a otras mutaciones.

Para completar los estudios de correlación genotipo-fenotipo, sería muy interesante llevar a cabo experimentos de expresión en células para las mutaciones detectadas como los estudios de Thompson *et al.*, [2005].

5.9. Diseño de un algoritmo diagnóstico

Tras la realización de este trabajo, se ha llegado a la conclusión de que el abordaje más eficiente para el estudio de pacientes con LCA y RP-IP es la aplicación conjunta de un microarray específico para genotipado de LCA complementado con cribado mutacional clásico (PCR + dHPLC seguido de secuenciación automática) y análisis familiar de haplotipos (utilizando STRs de los genes candidatos).

Hay que recalcar la importancia de conocer bien el fondo genético de la población a estudiar. Cuando se comenzó este trabajo se desconocía el espectro mutacional de los pacientes LCA de origen español, por lo que el abordaje inicial fue planteado de una forma estándar, tal y como se realizaba en otros países. El avance en el estudio de esta patología en nuestra población ha llevado a modificar el protocolo de estudio haciendo hincapié en el estudio prioritario de unos genes sobre otros o en la forma de tratar algunas mutaciones consideradas como tales en la literatura, considerándolos polimorfismos. A su vez, el haber incorporado las nuevas mutaciones encontradas en población española en las bases de datos y en el microarray LCA ha permitido tener una herramienta más eficaz para futuros estudios.

La identificación de las bases moleculares implicadas en la degeneración de la retina y su correlación con un fenotipo concreto permitirá a los clínicos establecer un diagnóstico y un pronóstico más exacto de la LCA.

La información obtenida gracias a este trabajo sobre la LCA en pacientes españoles ha permitido establecer un algoritmo diagnóstico (Fig. 5.10) para optimizar el abordaje de la LCA en nuestras familias.

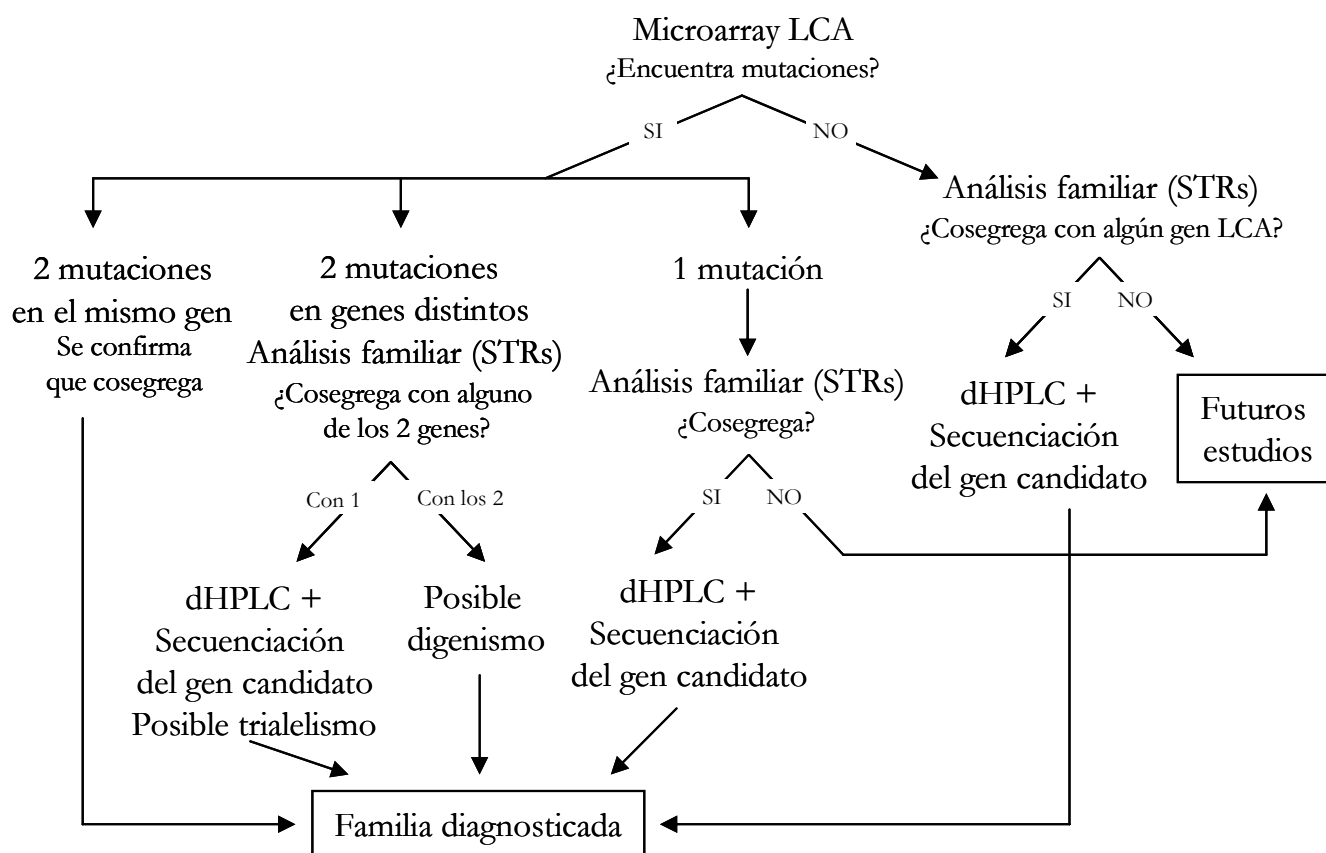


Figura 5.10. Algoritmo diagnóstico



“Amor victorioso”

Michelangelo Merisi da Caravaggio, 1601-1602

CONCLUSIONES

6. Conclusiones

1. La base de datos de DR es una herramienta esencial para el correcto manejo de los datos de los pacientes. Su aplicación no se limita sólo a esta tesis doctoral sino que queda establecida como herramienta de trabajo para la explotación de datos clínicos y genéticos para futuros estudios y ensayos terapéuticos tanto a nivel nacional como internacional.
2. *CRB1* es el principal gen responsable de la LCA en población española.
3. Los cambios p.Asp1114Gly en el gen *RPGRIP1*, p.Pro701Ser en *GUCY2D* y p.Tyr134Phe en *AIPL1*, son polimorfismos o mutaciones leves que pueden ejercer un efecto modificador en el fenotipo.
4. No se puede demostrar que existan casos de LCA o RP-IP de causa digénica, en cambio, no se puede descartar el trialelismo.
5. Se propone como asociación trialélica a considerar en futuros estudios la interacción entre *CEP290* (2 alelos mutados) y *RPGRIP1* (1 alelo mutado).
6. El fenotipo asociado a pacientes con mutaciones en *CRB1* es similar al reportado en la literatura (baja AV, fuerte hipermetropía, afectación macular, nistagmo y ERG abolido). El fenotipo PPRPE se asocia únicamente a pacientes con mutaciones en *CRB1*.
7. La mutación p.Cys998ter en *CEP290*, se asocia a pacientes con fenotipo LCA y no a RP-IP.
8. El gen *RDH12* se asocia en nuestra serie a un fenotipo LCA.
9. El abordaje más eficiente para el estudio de pacientes con LCA y RP-IP es la aplicación conjunta de un microarray específico para genotipado de LCA complementado con cribado mutacional clásico (PCR + dHPLC seguido de secuenciación automática) y análisis familiar de haplotipos (utilizando STRs de los genes candidatos).



Detalle de “Alegoría de la pintura”
Johannes Vermeer, 1667

BIBLIOGRAFÍA

7. Bibliografía

A

Acland GM, Aguirre GD, Ray J, Zhang Q, Aleman TS, Cideciyan AV, Pearce-Kelling SE, Anand V, Zeng Y, Maguire AM, Jacobson SG, Hauswirth WW, Bennett J. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet.* 2001 May;28(1):92-5.

Adams NA, Awadein A, Toma HS. The retinal ciliopathies. *Ophthalmic Genet.* 2007 Sep;28(3):113-25. Review.

Ali RR, Sarra GM, Stephens C, Alwis MD, Bainbridge JW, Munro PM, Fauser S, Reichel MB, Kinnon C, Hunt DM, Bhattacharya SS, Thrasher AJ. Restoration of photoreceptor ultrastructure and function in retinal degeneration slow mice by gene therapy. *Nat Genet.* 2000 Jul;25(3):306-10.

Ayuso C, Garcia-Sandoval B, Najera C, Valverde D, Carballo M, Antiñolo G. Retinitis pigmentosa in Spain. The Spanish Multicentric and Multidisciplinary Group for Research into Retinitis Pigmentosa. *Clin Genet.* 1995 Sep;48(3):120-2.

B

Baala L, Audollent S, Martinovic J, Ozilou C, Babron MC, Sivanandamoorthy S, Saunier S, Salomon R, Gonzales M, Rattenberry E, Esculpavit C, Toutain A, Moraine C, Parent P, Marcorelles P, Dauge MC, Roume J, Le Merrer M, Meiner V, Meir K, Menez F, Beaufrère AM, Francannet C, Tantau J, Sinico M, Dumez Y, MacDonald F, Munnich A, Lyonnet S, Gubler MC, Génin E, Johnson CA, Vekemans M, Encha-Razavi F, Attié-Bitach T. Pleiotropic effects of *CEP290* (*NPHP6*) mutations extend to Meckel syndrome. *Am J Hum Genet.* 2007 Jul;81(1):170-9.

Banerjee P, Lewis CA, Kleyn PW, Shugart YY, Ross BM, Penchaszadeh GK, Ott J, Jacobson SG, Gilliam TC, Knowles JA. Homozygosity and physical mapping of the autosomal recessive retinitis pigmentosa locus (RP14) on chromosome 6p21.3. *Genomics.* 1998 Mar 1;48(2):171-7.

Bellingham J, Wijesuriya SD, Evans K, Fryer A, Lennon G, Gregory CY. Genetic and physical localization of the gene causing cone-rod dystrophy (*CORD2*). In 'Degenerative Retinal Diseases', LaVail, et al. eds, Plenum Press. 1997.

- Bernal S, Calaf M, Garcia-Hoyos M, Garcia-Sandoval B, Rosell J, Adan A, Ayuso C, Baiget M. Study of the involvement of the *RGR*, *CRPBI*, and *CRB1* genes in the pathogenesis of autosomal recessive retinitis pigmentosa. *J Med Genet*. 2003 Jul;40(7):e89.
- Bertrand E y Faupel M. *Subcellular Proteomics*. Springer, 2007. 209-235.
- Berson EL, Sandberg MA, Rosner B, Birch DG, Hanson AH. Natural course of retinitis pigmentosa over a three-year interval. *Am J Ophthalmol*. 1985 Mar 15;99(3):240-51.
- Bibb LC, Holt JK, Tardt EE, Hodges MD, Gregory-Evans K, Rutherford A, Lucas RJ, Sowden JC, Gregory-Evans CY. Temporal and spatial expression patterns of the *CRX* transcription factor and its downstream targets. Critical differences during human and mouse eye development. *Hum Mol Genet*. 2001 Jul 15;10(15):1571-9.
- Booij JC, Florijn RJ, ten Brink JB, Loves W, Meire F, van Schooneveld MJ, de Jong PT, Bergen AA. Identification of mutations in the *AIPL1*, *CRB1*, *GUCY2D*, *RPE65*, and *RPGRIP1* genes in patients with juvenile retinitis pigmentosa. *J Med Genet*. 2005 Nov;42(11):e67.
- Bowne SJ, Sullivan LS, Mortimer SE, Hedstrom L, Zhu J, Spellicy CJ, Gire AI, Hughbanks-Wheaton D, Birch DG, Lewis RA, Heckenlively JR, Daiger SP. Spectrum and frequency of mutations in *IMPDH1* associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa and leber congenital amaurosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006 Jan;47(1):34-42.
- Boylan JP, Wright AF. Identification of a novel protein interacting with *RPGR*. *Hum Mol Genet*. 2000 Sep 1;9(14):2085-93.

C

- Camuzat A, Dollfus H, Rozet JM, Gerber S, Bonneau D, Bonnemaïson M, Briard ML, Dufier JL, Ghazi I, Leowski C, Weissenbach J, Frezal J, Munnich A, Kaplan J. A gene for Leber's congenital amaurosis maps to chromosome 17p. *Hum Mol Genet*. 1995 Aug;4(8):1447-52.
- Camuzat A, Rozet JM, Dollfus H, Gerber S, Perrault I, Weissenbach J, Munnich A, Kaplan J. Evidence of genetic heterogeneity of Leber's congenital amaurosis (LCA) and mapping of LCA1 to chromosome 17p13. *Hum Genet*. 1996 Jun;97(6):798-801.
- Codex Calixtinus* Catedral de Santiago de Compostela, Archivo de la Catedral, s.n. Galicia, España.
- Cremers FP, van den Hurk JA, den Hollander AI. Molecular genetics of Leber congenital amaurosis. *Hum Mol Genet*. 2002 May 15;11(10):1169-76. Review.

CH

Chang B, Khanna H, Hawes N, Jimeno D, He S, Lillo C, Parapuram SK, Cheng H, Scott A, Hurd RE, Sayer JA, Otto EA, Attanasio M, O'Toole JF, Jin G, Shou C, Hildebrandt F, Williams DS, Heckenlively JR, Swaroop A. In-frame deletion in a novel centrosomal/ciliary protein *CEP290/NPHP6* perturbs its interaction with *RPGR* and results in early-onset retinal degeneration in the rd16 mouse. *Hum Mol Genet.* 2006 Jun 1;15(11):1847-57.

Chen S, Wang QL, Nie Z, Sun H, Lennon G, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Zack DJ. *CRX*, a novel Otx-like paired-homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes. *Neuron.* 1997 Nov;19(5):1017-30.

D

De Laey JJ. Leber's congenital amaurosis. *Bull Soc Belge Ophtalmol.* 1991;241:41-50. Review

den Hollander AI, ten Brink JB, de Kok YJ, van Soest S, van den Born LI, van Driel MA, van de Pol DJ, Payne AM, Bhattacharya SS, Kellner U, Hoyng CB, Westerveld A, Brunner HG, Bleeker-Wagemakers EM, Deutman AF, Heckenlively JR, Cremers FP, Bergen AA. Mutations in a human homologue of *Drosophila crumbs* cause retinitis pigmentosa (RP12). *Nat Genet.* 1999 Oct;23(2):217-21.

den Hollander AI, Johnson K, de Kok YJ, Klebes A, Brunner HG, Knust E, Cremers FP. *CRB1* has a cytoplasmic domain that is functionally conserved between human and *Drosophila*. *Hum Mol Genet.* 2001a Nov 15;10(24):2767-73.

den Hollander AI, Heckenlively JR, van den Born LI, de Kok YJ, van der Velde-Visser SD, Kellner U, Jurkles B, van Schooneveld MJ, Blankenagel A, Rohrschneider K, Wissinger B, Cruysberg JR, Deutman AF, Brunner HG, Apfelstedt-Sylla E, Hoyng CB, Cremers FP. Leber congenital amaurosis and retinitis pigmentosa with Coats-like exudative vasculopathy are associated with mutations in the crumbs homologue 1 (*CRB1*) gene. *Am J Hum Genet.* 2001b Jul;69(1):198-203.

den Hollander AI, Davis J, van der Velde-Visser SD, Zonneveld MN, Pierrottet CO, Koenekoop RK, Kellner U, van den Born LI, Heckenlively JR, Hoyng CB, Handford PA, Roepman R, Cremers FP. *CRB1* mutation spectrum in inherited retinal dystrophies. 1: *Hum Mutat.* 2004 Nov;24(5):355-69.

den Hollander AI, Koenekoop RK, Yzer S, Lopez I, Arends ML, Voesenek KE, Zonneveld MN, Strom TM, Meitinger T, Brunner HG, Hoyng CB, van den Born LI, Rohrschneider K, Cremers FP. Mutations in the *CEP290 (NPHP6)* gene are a frequent cause of Leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet.* 2006 Sep;79(3):556-61.

den Hollander AI, Koenekoop RK, Mohamed MD, Arts HH, Boldt K, Towns KV, Sedmak T, Beer M, Nagel-Wolfrum K, McKibbin M, Dharmaraj S, Lopez I, Ivings L, Williams GA, Springell K, Woods CG, Jafri H, Rashid Y, Strom TM, van der Zwaag B, Gosens I, Kersten FF, van Wijk E, Veltman JA, Zonneveld MN, van Beersum SE, Maumenee IH, Wolfrum U, Cheetham ME, Ueffing M, Cremers FP, Inglehearn CF, Roepman R. Mutations in *LCA5*, encoding the ciliary protein lebercilin, cause Leber congenital amaurosis. 1: Nat Genet. 2007 Jul;39(7):889-95.

Dharmaraj S, Li Y, Robitaille JM, Silva E, Zhu D, Mitchell TN, Maltby LP, Baffoe-Bonnie AB, Maumenee IH. A novel locus for Leber congenital amaurosis maps to chromosome 6q. Am J Hum Genet. 2000 Jan;66(1):319-26.

Dryja TP, Adams SM, Grimsby JL, McGee TL, Hong DH, Li T, Andréasson S, Berson EL. Null *RPGRIP1* alleles in patients with Leber congenital amaurosis. Am J Hum Genet. 2001 May;68(5):1295-8.

E

Evans K, Duvall-Young J, Fitzke FW, Arden GB, Bhattacharya SS, Bird AC. Chromosome 19q cone-rod retinal dystrophy. Ocular phenotype. Arch Ophthalmol. 1995 Feb;113(2):195-201.

Evans K, Fryer A, Inglehearn C, Duvall-Young J, Whittaker JL, Gregory CY, Butler R, Ebenezer N, Hunt DM, Bhattacharya S. Genetic linkage of cone-rod retinal dystrophy to chromosome 19q and evidence for segregation distortion. Nat Genet. 1994 Feb;6(2):210-3.

F

Franceschetti A, Dieterle P. Diagnostic and prognostic importance of the electroretinogram in tapetoretinal degeneration with reduction of the visual field and hemeralopia. Confin Neurol. 1954;14(2-3):184-6.

Freund CL, Gregory-Evans CY, Furukawa T, Papaioannou M, Looser J, Ploder L, Bellingham J, Ng D, Herbrick JA, Duncan A, Scherer SW, Tsui LC, Loutradis-Anagnostou A, Jacobson SG, Cepko CL, Bhattacharya SS, McInnes RR. Cone-rod dystrophy due to mutations in a novel photoreceptor-specific homeobox gene (*CRX*) essential for maintenance of the photoreceptor. Cell. 1997 Nov 14;91(4):543-53.

Freund CL, Wang QL, Chen S, Muskat BL, Wiles CD, Sheffield VC, Jacobson SG, McInnes RR, Zack DJ, Stone EM. De novo mutations in the *CRX* homeobox gene associated with Leber congenital amaurosis. *Nat Genet.* 1998 Apr;18(4):311-2.

Friedman JS, Chang B, Kannabiran C, Chakarova C, Singh HP, Jalali S, Hawes NL, Branham K, Othman M, Filippova E, Thompson DA, Webster AR, Andréasson S, Jacobson SG, Bhattacharya SS, Heckenlively JR, Swaroop A. Premature truncation of a novel protein, *RD3*, exhibiting subnuclear localization is associated with retinal degeneration. 1: *Am J Hum Genet.* 2006 Dec;79(6):1059-70.

Furukawa T, Morrow EM, Cepko CL. *CRX*, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation. *Cell.* 1997 Nov 14;91(4):531-41.

Furukawa T, Morrow EM, Li T, Davis FC, Cepko CL. Retinopathy and attenuated circadian entrainment in *CRX*-deficient mice. *Nat Genet.* 1999 Dec;23(4):466-70.

G

Galvin JA, Fishman GA, Stone EM, Koenekoop RK. Evaluation of genotype-phenotype associations in leber congenital amaurosis. *Retina.* 2005 Oct-Nov;25(7):919-29.

Gerber S, Perrault I, Hanein S, Barbet F, Ducroq D, Ghazi I, Martin-Coignard D, Leowski C, Homfray T, Dufier JL, Munnich A, Kaplan J, Rozet JM. Complete exon-intron structure of the *RPGR*-interacting protein (*RPGRIP1*) gene allows the identification of mutations underlying Leber congenital amaurosis. *Eur J Hum Genet.* 2001 Aug;9(8):561-71.

Gerber S, Perrault I, Hanein S, Shalev S, Zlotogora J, Barbet F, Ducroq D, Dufier J, Munnich A, Rozet J, Kaplan J. A novel mutation disrupting the cytoplasmic domain of *CRB1* in a large consanguineous family of Palestinian origin affected with Leber congenital amaurosis. *Ophthalmic Genet.* 2002 Dec;23(4):225-35.

Gregory CY, Evans K, Whittaker JL, Fryer A, Weissenbach J, Bhattacharya SS. Refinement of the cone-rod retinal dystrophy locus on chromosome 19q. *Am J Hum Genet.* 1994 Nov;55(5):1061-3.

Gu SM, Thompson DA, Srikumari CR, Lorenz B, Finckh U, Nicoletti A, Murthy KR, Rathmann M, Kumaramanickavel G, Denton MJ, Gal A. Mutations in *RPE65* cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nat Genet.* 1997 Oct;17(2):194-7.

H

- Haeseleer F, Jang GF, Imanishi Y, Driessen CA, Matsumura M, Nelson PS, Palczewski K. Dual-substrate specificity short chain retinol dehydrogenases from the vertebrate retina. *J Biol Chem*. 2002 Nov 22;277(47):45537-46.
- Hameed A, Khaliq S, Ismail M, Anwar K, Ebenezer ND, Jordan T, Mehdi SQ, Payne AM, Bhattacharya SS. A novel locus for Leber congenital amaurosis (*LC44*) with anterior keratoconus mapping to chromosome 17p13. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000 Mar;41(3):629-33.
- Hancin S, Perrault I, Gerber S, Tanguy G, Barbet F, Ducroq D, Calvas P, Dollfus H, Hamel C, Loppönen T, Munier F, Santos L, Shalev S, Zafeiriou D, Dufier JL, Munnich A, Rozet JM, Kaplan J. Leber congenital amaurosis: comprehensive survey of the genetic heterogeneity, refinement of the clinical definition, and genotype-phenotype correlations as a strategy for molecular diagnosis. *Hum Mutat*. 2004 Apr;23(4):306-17
- Heckenlively JR.. Preserved para-arteriole retinal pigment epithelium (PPRPE) in retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol*. 1982 Jan;66(1):26-30.
- Heckenlively JR. Retinitis Pigmentosa. 1988. Lippincott, Philadelphia.
- Henderson RH, Waseem N, Searle R, van der Spuy J, Russell-Eggitt I, Bhattacharya SS, Thompson DA, Holder GE, Cheetham ME, Webster AR, Moore AT. An assessment of the apex microarray technology in genotyping patients with leber congenital amaurosis and early-onset severe retinal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007 Dec;48(12):5684-9.
- Hong DH, Yue G, Adamian M, Li T. Retinitis pigmentosa GTPase regulator (*RPGR*)-interacting protein is stably associated with the photoreceptor ciliary axoneme and anchors *RPGR* to the connecting cilium. *J Biol Chem*. 2001 Apr 13;276(15):12091-9.

J

- Jacobson SG, Cideciyan AV, Aleman TS, Pianta MJ, Sumaroka A, Schwartz SB, Smilko EE, Milam AH, Sheffield VC, Stone EM. Crumbs homolog 1 (*CRB1*) mutations result in a thick human retina with abnormal lamination. *Hum Mol Genet*. 2003 May 1;12(9):1073-8.
- Janecke AR, Thompson DA, Utermann G, Becker C, Hübner CA, Schmid E, McHenry CL, Nair AR, Rüschemdorf F, Heckenlively J, Wissinger B, Nürnberg P, Gal A. Mutations in *RDH12* encoding a photoreceptor cell retinol dehydrogenase cause childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nat Genet*. 2004 Aug;36(8):850-4.

K

- Kaplan J, Bonneau D, Frézal J, Munnich A, Dufier JL. Clinical and genetic heterogeneity in retinitis pigmentosa. *Hum Genet.* 1990 Oct;85(6):635-42.
- Kawamura, S. Phototransduction, excitation and adaptation. In "Neurobiology and Clinical Aspects of the Outer Retina" (Eds. Djamgoz, M.B.A., Archer, S.N. and Vallerga, S.) 1995 Chapman & Hall, London, pp. 105-131.
- Keen TJ, Mohamed MD, McKibbin M, Rashid Y, Jafri H, Maumenee IH, Inglehearn CF. Identification of a locus (*LC49*) for Leber's congenital amaurosis on chromosome 1p36. *Eur J Hum Genet.* 2003 May;11(5):420-3.
- Kelsell RE, Evans K, Gregory CY, Moore AT, Bird AC, Hunt DM. Localisation of a gene for dominant cone-rod dystrophy (*CORD6*) to chromosome 17p. *Hum Mol Genet.* 1997 Apr;6(4):597-600.
- Kelsell RE, Gregory-Evans K, Payne AM, Perrault I, Kaplan J, Yang RB, Garbers DL, Bird AC, Moore AT, Hunt DM. Mutations in the retinal guanylate cyclase (*RETGC-1*) gene in dominant cone-rod dystrophy. *Hum Mol Genet.* 1998 Jul;7(7):1179-84.
- Khaliq S, Abid A, Hameed A, Anwar K, Mohyuddin A, Azmat Z, Shami SA, Ismail M, Mehdi SQ. Mutation screening of Pakistani families with congenital eye disorders. *Exp Eye Res.* 2003 Mar;76(3):343-8.
- Knust E, Bossinger O. Composition and formation of intercellular junctions in epithelial cells. *Science.* 2002 Dec 6;298(5600):1955-9. Review.
- Koenekoop RK. *RPGRIP1* is mutated in Leber congenital amaurosis: a mini-review. *Ophthalmic Genet.* 2005 Dec;26(4):175-9. Review.
- Koenekoop RK, Cremers FP, den Hollander AI. Leber congenital amaurosis: ciliary proteins on the move. *Ophthalmic Genet.* 2007 Sep;28(3):111-2. Review.

L

- La Spada AR, Fu YH, Sopher BL, Libby RT, Wang X, Li LY, Einum DD, Huang J, Possin DE, Smith AC, Martinez RA, Koszdin KL, Treuting PM, Ware CB, Hurley JB, Ptáček LJ, Chen S. Polyglutamine-expanded ataxin-7 antagonizes *CRX* function and induces cone-rod dystrophy in a mouse model of SCA7. *Neuron.* 2001 Sep 27;31(6):913-27.

- Lafuente M. Historia general de España. 1850-1867.
- Leber T. Über Retinitis Pigmentosa und angeborene Amaurose. Albrecht Von Graefes Arch Ophthalmol 1869; 15:1-25.
- Lem J, Flannery JG, Li T, Applebury ML, Farber DB, Simon MI. Retinal degeneration is rescued in transgenic rd mice by expression of the cGMP phosphodiesterase beta subunit. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 May 15;89(10):4422-6.
- Leutelt J, Oehlmann R, Younus F, van den Born LI, Weber JL, Denton MJ, Mehdi SQ, Gal A. Autosomal recessive retinitis pigmentosa locus maps on chromosome 1q in a large consanguineous family from Pakistan. Clin Genet. 1995 Mar;47(3):122-4.
- Li X, Chen S, Wang Q, Zack DJ, Snyder SH, Borjigin J. A pineal regulatory element (PIRE) mediates transactivation by the pineal/retina-specific transcription factor CRX. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Feb 17;95(4):1876-81.
- Liu X, Seno K, Nishizawa Y, Hayashi F, Yamazaki A, Matsumoto H, Wakabayashi T, Usukura J. Ultrastructural localization of retinal guanylate cyclase in human and monkey retinas. Exp Eye Res. 1994 Dec;59(6):761-8.
- Lotery AJ, Namperumalsamy P, Jacobson SG, Weleber RG, Fishman GA, Musarella MA, Hoyt CS, Héon E, Levin A, Jan J, Lam B, Carr RE, Franklin A, Radha S, Andorf JL, Sheffield VC, Stone EM. Mutation analysis of 3 genes in patients with Leber congenital amaurosis. Arch Ophthalmol. 2000 Apr;118(4):538-43.
- Lotery AJ, Jacobson SG, Fishman GA, Weleber RG, Fulton AB, Namperumalsamy P, Héon E, Levin AV, Grover S, Rosenow JR, Kopp KK, Sheffield VC, Stone EM. Mutations in the *CRB1* gene cause Leber congenital amaurosis. Arch Ophthalmol. 2001a Mar;119(3):415-20.
- Lotery AJ, Malik A, Shami SA, Sindhi M, Chohan B, Maqbool C, Moore PA, Denton MJ, Stone EM. *CRB1* mutations may result in retinitis pigmentosa without para-arteriolar RPE preservation. Ophthalmic Genet. 2001b Sep;22(3):163-9.
- Lu X, Guraju M, Oswald J, Ferreira PA. Limited proteolysis differentially modulates the stability and subcellular localization of domains of *RPGRIP1* that are distinctly affected by mutations in Leber's congenital amaurosis. Hum Mol Genet. 2005 May 15;14(10):1327-40.

M

- Makino CL, Wen XH, Michaud N, Peshenko IV, Pawlyk B, Brush RS, Soloviev M, Liu X, Woodruff ML, Calvert PD, Savchenko AB, Anderson RE, Fain GL, Li T, Sandberg MA, Dizhoor AM. Effects of low *AIPL1* expression on phototransduction in rods. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006 May;47(5):2185-94.
- Marcos I, Ruiz A, Borrego S, Ayuso C, Baiget M, Antiñolo G. Molecular analysis of the *RPE65* gene in 72 Spanish families with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Med Clin (Barc)*. 2001 Jun 30;117(4):121-3.
- Marlhens F, Bareil C, Griffoin JM, Zrenner E, Amalric P, Eliaou C, Liu SY, Harris E, Redmond TM, Arnaud B, Claustres M, Hamel CP. Mutations in *RPE65* cause Leber's congenital amaurosis. *Nat Genet*. 1997 Oct;17(2):139-41.
- Marmor MF. An international standard for electroretinography. *Doc Ophthalmol*. 1989 Dec;73(4):299-302.
- Mavlyutov TA, Zhao H, Ferreira PA. Species-specific subcellular localization of RPGR and *RPGRIP* isoforms: implications for the phenotypic variability of congenital retinopathies among species. *Hum Mol Genet*. 2002 Aug 1;11(16):1899-907.
- McKay GJ, Clarke S, Davis JA, Simpson DA, Silvestri G. Pigmented paravenous chorioretinal atrophy is associated with a mutation within the crumbs homolog 1 (*CRB1*) gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005 Jan;46(1):322-8.
- Mears AJ, Kondo M, Swain PK, Takada Y, Bush RA, Saunders TL, Sieving PA, Swaroop A. Nrl is required for rod photoreceptor development. *Nat Genet*. 2001 Dec;29(4):447-52.
- Mehalow AK, Kameya S, Smith RS, Hawes NL, Denegre JM, Young JA, Bechtold L, Haider NB, Tepass U, Heckenlively JR, Chang B, Naggert JK, Nishina PM. *CRB1* is essential for external limiting membrane integrity and photoreceptor morphogenesis in the mammalian retina. *Hum Mol Genet*. 2003 Sep 1;12(17):2179-89.
- Meindl A, Dry K, Herrmann K, Manson F, Ciccodicola A, Edgar A, Carvalho MR, Achatz H, Hellebrand H, Lennon A, Migliaccio C, Porter K, Zrenner E, Bird A, Jay M, Lorenz B, Wittwer B, D'Urso M, Meitinger T, Wright A. A gene (*RPGR*) with homology to the *RCC1* guanine nucleotide exchange factor is mutated in X-linked retinitis pigmentosa (RP3). *Nat Genet*. 1996 May;13(1):35-42.
- Mellersh CS, Boursnell ME, Pettitt L, Ryder EJ, Holmes NG, Grafham D, Forman OP, Sampson J, Barnett KC, Blanton S, Binns MM, Vaudin M. Canine *RPGRIP1* mutation establishes cone-rod dystrophy in miniature longhaired dachshunds as a homologue of human Leber congenital amaurosis. *Genomics*. 2006 Sep;88(3):293-301.

Meuleman J, van de Pavert SA, Wijnholds J. Crumbs homologue 1 in polarity and blindness. *Biochem Soc Trans*. 2004 Nov;32(Pt 5):828-30. Review.

Michel D, Arsanto JP, Massey-Harroche D, Béclin C, Wijnholds J, Le Bivic A. PATJ connects and stabilizes apical and lateral components of tight junctions in human intestinal cells. *J Cell Sci*. 2005 Sep 1;118(Pt 17):4049-57.

Mitton KP, Swain PK, Chen S, Xu S, Zack DJ, Swaroop A. The leucine zipper of NRL interacts with the CRX homeodomain. A possible mechanism of transcriptional synergy in rhodopsin regulation. *J Biol Chem*. 2000 Sep 22;275(38):29794-9.

P

Pawlyk BS, Smith AJ, Buch PK, Adamian M, Hong DH, Sandberg MA, Ali RR, Li T. Gene replacement therapy rescues photoreceptor degeneration in a murine model of Leber congenital amaurosis lacking *RPGRIP*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005 Sep;46(9):3039-45.

Payne AM, Morris AG, Downes SM, Johnson S, Bird AC, Moore AT, Bhattacharya SS, Hunt DM. Clustering and frequency of mutations in the retinal guanylate cyclase (*GUCY2D*) gene in patients with dominant cone-rod dystrophies. *J Med Genet*. 2001 Sep;38(9):611-4.

Pelikka M, Tanentzapf G, Pinto M, Smith C, McGlade CJ, Ready DF, Tepass U. Crumbs, the *Drosophila* homologue of human *CRB1*/RP12, is essential for photoreceptor morphogenesis. *Nature*. 2002 Mar 14;416(6877):143-9.

Perrault I, Rozet JM, Calvas P, Gerber S, Camuzat A, Dollfus H, Châtelain S, Souied E, Ghazi I, Leowski C, Bonnemaïson M, Le Paslier D, Frézal J, Dufier JL, Pittler S, Munnich A, Kaplan J. Retinal-specific guanylate cyclase gene mutations in Leber's congenital amaurosis. *Nat Genet*. 1996 Dec;14(4):461-4.

Perrault I, Rozet JM, Gerber S, Kelsell RE, Souied E, Cabot A, Hunt DM, Munnich A, Kaplan J. A retGC-1 mutation in autosomal dominant cone-rod dystrophy. *Am J Hum Genet*. 1998 Aug;63(2):651-4.

Perrault I, Rozet JM, Gerber S, Ghazi I, Ducroq D, Souied E, Leowski C, Bonnemaïson M, Dufier JL, Munnich A, Kaplan J. Spectrum of retGC1 mutations in Leber's congenital amaurosis. *Eur J Hum Genet*. 2000 Aug;8(8):578-82.

Perrault I, Gerber S, Hanein S, Picaud S, Rozet JM, Dufier JL, Munnich A, Sahel J, Kaplan J. Leber congenital amaurosis-genotyping required for possible inclusion in a clinical trial. *Adv Exp Med Biol*. 2003a;533:69-77. Review.

Perrault I, Hanein S, Gerber S, Barbet F, Dufier JL, Munnich A, Rozet JM, Kaplan J. Evidence of autosomal dominant Leber congenital amaurosis (LCA) underlain by a *CRX* heterozygous null allele. *J Med Genet*. 2003b Jul;40(7):e90.

Perrault I, Hanein S, Gerber S, Barbet F, Ducroq D, Dollfus H, Hamel C, Dufier JL, Munnich A, Kaplan J, Rozet JM. Retinal dehydrogenase 12 (*RDH12*) mutations in leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet*. 2004 Oct;75(4):639-46.

Perrault I, Delphin N, Hanein S, Gerber S, Dufier JL, Roche O, Defoort-Dhellemmes S, Dollfus H, Fazzi E, Munnich A, Kaplan J, Rozet JM. Spectrum of *NPHP6/CEP290* mutations in Leber congenital amaurosis and delineation of the associated phenotype. *Hum Mutat*. 2007 Apr;28(4):416.

R

Ramamurthy V, Roberts M, van den Akker F, Niemi G, Reh TA, Hurley JB. *AIPL1*, a protein implicated in Leber's congenital amaurosis, interacts with and aids in processing of farnesylated proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci*. 2003 100:12630-12635.

Ramamurthy V, Niemi GA, Reh TA, Hurley JB. Leber congenital amaurosis linked to *AIPL1*: a mouse model reveals destabilization of cGMP phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Sep 21;101(38):13897-902.

Rath MF, Muñoz E, Ganguly S, Morin F, Shi Q, Klein DC, Møller M. Expression of the *Otx2* homeobox gene in the developing mammalian brain: embryonic and adult expression in the pineal gland. *J Neurochem*. 2006 Apr;97(2):556-66.

Richard M, Roepman R, Aartsen WM, van Rossum AG, den Hollander AI, Knust E, Wijnholds J, Cremers FP. Towards understanding CRUMBS function in retinal dystrophies. *Hum Mol Genet*. 2006 Oct 15;15 Spec No 2:R235-43.

Riveiro-Alvarez R*, Vallespin E*, Wilke R, Garcia-Sandoval B, Cantalapiedra D, Aguirre-Lamban J, Avila A, Gimenez A, Trujillo-Tiebas MJ, Ayuso C. **These two authors contributed equally to this publication.* Molecular analysis of *ABCA4* and *CRB1* genes in one mixed Spanish family segregating Stargardt disease and Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa. *Mol. Vis*. 2007 *Pendiente de paginación.*

Rivolta C, Sharon D, DeAngelis MM, Dryja TP. Retinitis pigmentosa and allied diseases: numerous diseases, genes, and inheritance patterns. *Hum Mol Genet*. 2002 May 15;11(10):1219-27. Review.

- Roepman R, van Duijnhoven G, Rosenberg T, Pinckers AJ, Bleeker-Wagemakers LM, Bergen AA, Post J, Beck A, Reinhardt R, Ropers HH, Cremers FP, Berger W. Positional cloning of the gene for X-linked retinitis pigmentosa 3: homology with the guanine-nucleotide-exchange factor *RCC1*. *Hum Mol Genet*. 1996 Jul;5(7):1035-41.
- Roepman R, Bernoud-Hubac N, Schick DE, Maugeri A, Berger W, Ropers HH, Cremers FP, Ferreira PA. The retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR) interacts with novel transport-like proteins in the outer segments of rod photoreceptors. *Hum Mol Genet*. 2000 Sep 1;9(14):2095-105.
- Roepman R, Wolfrum U. Protein networks and complexes in photoreceptor cilia. *Subcell Biochem*. 2007;43:209-35. Review.
- Roh MH, Fan S, Liu CJ, Margolis B. The Crumbs3-Pals1 complex participates in the establishment of polarity in mammalian epithelial cells. *J Cell Sci*. 2003 Jul 15;116(Pt 14):2895-906.
- Ruiz A, Winston A, Lim YH, Gilbert BA, Rando RR, Bok D. Molecular and biochemical characterization of lecithin retinol acyltransferase. 1: *J Biol Chem*. 1999 Feb 5;274(6):3834-41.
- García-Sandoval B. La retinosis pigmentaria en España: estudio clínico y genético. ONCE. 2001. Capítulo II:39-68.

S

- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology*. 1992;24:104-8.
- Sayer JA, Otto EA, O'Toole JF, Nurnberg G, Kennedy MA, Becker C, Hennies HC, Helou J, Attanasio M, Fausett BV, Utsch B, Khanna H, Liu Y, Drummond I, Kawakami I, Kusakabe T, Tsuda M, Ma L, Lee H, Larson RG, Allen SJ, Wilkinson CJ, Nigg EA, Shou C, Lillo C, Williams DS, Hoppe B, Kemper MJ, Neuhaus T, Parisi MA, Glass IA, Petry M, Kispert A, Gloy J, Ganner A, Walz G, Zhu X, Goldman D, Nurnberg P, Swaroop A, Leroux MR, Hildebrandt F. The centrosomal protein nephrocystin-6 is mutated in Joubert syndrome and activates transcription factor ATF4. *Nat Genet*. 2006 Jun;38(6):674-81.
- Semple-Rowland SL, Lee NR, Van Hooser JP, Palczewski K, Baehr W. A null mutation in the photoreceptor guanylate cyclase gene causes the retinal degeneration chicken phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Feb 3;95(3):1271-6.

- Simonelli F, Ziviello C, Testa F, Rossi S, Fazzi E, Bianchi PE, Fossarello M, Signorini S, Bertone C, Galantuomo S, Brancati F, Valente EM, Ciccodicola A, Rinaldi E, Auricchio A, Banfi S. Clinical and molecular genetics of Leber's congenital amaurosis: a multicenter study of Italian patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007 Sep;48(9):4284-90.
- Sohocki MM, Sullivan LS, Mintz-Hittner HA, Birch D, Heckenlively JR, Freund CL, McInnes RR, Daiger SP. A range of clinical phenotypes associated with mutations in *CRX*, a photoreceptor transcription-factor gene. *Am J Hum Genet*. 1998 Nov;63(5):1307-15.
- Sohocki MM, Malone KA, Sullivan LS, Daiger SP. Localization of retina/pineal-expressed sequences: identification of novel candidate genes for inherited retinal disorders. *Genomics*. 1999 May 15;58(1):29-33.
- Sohocki MM, Bowne SJ, Sullivan LS, Blackshaw S, Cepko CL, Payne AM, Bhattacharya SS, Khaliq S, Qasim Mehdi S, Birch DG, Harrison WR, Elder FF, Heckenlively JR, Daiger SP. Mutations in a new photoreceptor-pineal gene on 17p cause Leber congenital amaurosis. 1: *Nat Genet*. 2000 Jan;24(1):79-83.
- Stockton DW, Lewis RA, Abboud EB, Al-Rajhi A, Jabak M, Anderson KL, Lupski JR. A novel locus for Leber congenital amaurosis on chromosome 14q24. *Hum Genet*. 1998 Sep;103(3):328-33.
- Straight SW, Shin K, Fogg VC, Fan S, Liu CJ, Roh M, Margolis B. Loss of *PALS1* expression leads to tight junction and polarity defects. *Mol Biol Cell*. 2004 Apr;15(4):1981-90.
- Stryer L. Visual excitation and recovery. *J Biol Chem*. 1991 Jun 15;266(17):10711-4. Review.
- Swain PK, Chen S, Wang QL, Affatigato LM, Coats CL, Brady KD, Fishman GA, Jacobson SG, Swaroop A, Stone E, Sieving PA, Zack DJ. Mutations in the cone-rod homeobox gene are associated with the cone-rod dystrophy photoreceptor degeneration. *Neuron*. 1997 Dec;19(6):1329-36.
- Swaroop A, Wang QL, Wu W, Cook J, Coats C, Xu S, Chen S, Zack DJ, Sieving PA. Leber congenital amaurosis caused by a homozygous mutation (R90W) in the homeodomain of the retinal transcription factor *CRX*: direct evidence for the involvement of *CRX* in the development of photoreceptor function. *Hum Mol Genet*. 1999 Feb;8(2):299-305.
- Sweeney MO, McGee TL, Berson EL, Dryja TP. Low prevalence of lecithin retinol acyltransferase mutations in patients with Leber congenital amaurosis and autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Mol Vis*. 2007 Apr 5;13:588-93.

T

- Tepass U, Theres C, Knust E. Crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of *Drosophila* epithelial cells and required for organization of epithelia. *Cell*. 1990 Jun 1;61(5):787-99.
- Tepass U. Adherens junctions: new insight into assembly, modulation and function. *Bioessays*. 2002 Aug;24(8):690-5. Review.
- Thompson DA, Li Y, McHenry CL, Carlson TJ, Ding X, Sieving PA, Apfelstedt-Sylla E, Gal A. Mutations in the gene encoding lecithin retinol acyltransferase are associated with early-onset severe retinal dystrophy. *Nat Genet*. 2001 Jun;28(2):123-4.
- Thompson DA, Janecke AR, Lange J, Feathers KL, Hübner CA, McHenry CL, Stockton DW, Rammesmayr G, Lupski JR, Antinolo G, Ayuso C, Baiget M, Gouras P, Heckenlively JR, den Hollander A, Jacobson SG, Lewis RA, Sieving PA, Wissinger B, Yzer S, Zrenner E, Utermann G, Gal A. Retinal degeneration associated with *RDH12* mutations results from decreased 11-cis retinal synthesis due to disruption of the visual cycle. *Hum Mol Genet*. 2005 Dec 15;14(24):3865-75.
- Travis GH, Groshan KR, Lloyd M, Bok D. Complete rescue of photoreceptor dysplasia and degeneration in transgenic retinal degeneration slow (rds) mice. *Neuron*. 1992 Jul;9(1):113-9.
- Tzekov RT, Liu Y, Sohocki MM, Zack DJ, Daiger SP, Heckenlively JR, Birch DG. Autosomal dominant retinal degeneration and bone loss in patients with a 12-bp deletion in the *CRX* gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001 May;42(6):1319-27.

V

- Valente EM, Silhavy JL, Brancati F, Barrano G, Krishnaswami SR, Castori M, Lancaster MA, Boltshauser E, Boccone L, Al-Gazali L, Fazzi E, Signorini S, Louie CM, Bellacchio E; International Joubert Syndrome Related Disorders Study Group, Bertini E, Dallapiccola B, Gleeson JG. Mutations in *CEP290*, which encodes a centrosomal protein, cause pleiotropic forms of Joubert syndrome. *Nat Genet*. 2006 Jun;38(6):623-5.
- Vallespin E, Cantalapiedra D, Garcia-Hoyos M, Riveiro R, Queipo A, Trujillo-Tiebas MJ, Ayuso C. Gene symbol: *CRB1*. Disease: Leber congenital amaurosis. *Hum Genet*. 2006c Feb;118(6):778.
- Vallespin E, Cantalapiedra D, Garcia-Hoyos M, Riveiro R, Villaverde C, Trujillo-Tiebas MJ, Ayuso C. Gene symbol: *CRB1*. Disease: Leber congenital amaurosis. *Hum Genet*. 2006a Feb;118(6):777.

- Vallespin E, Cantalapiedra D, Garcia-Hoyos M, Riveiro R, Villaverde C, Trujillo-Tiebas MJ, Ayuso C. Gene symbol: *CRB1*. Disease: Leber congenital amaurosis. Hum Genet. 2006b Feb;118(6):774.
- Vallespin E, Cantalapiedra D, Riveiro-Alvarez R, Wilke R, Aguirre-Lamban J, Avila-Fernandez A, Lopez-Martinez MA, Gimenez A, Jose Trujillo-Tiebas M, Ramos C, Ayuso C. Mutation screening of 299 spanish families with retinal dystrophies by leber congenital amaurosis genotyping microarray. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007d Dec;48(12):5653-61.
- Vallespin E, Lopez-Martinez MA, Cantalapiedra D, Riveiro-Alvarez R, Aguirre-Lamban J, Avila-Fernandez A, Villaverde C, Trujillo-Tiebas MJ, Ayuso C. Frequency of *CEP290* c.2991_1655A>G mutation in 175 Spanish families affected with Leber congenital amaurosis and early-onset retinitis pigmentosa. Mol Vis. 2007c Nov 27;13:2160-2.
- Vallespin E, Millan JM, Riveiro-Alvarez R, Aguirre-Lamban J, Cantalapiedra D, Gallego J, Trujillo-Tiebas MJ, Ayuso C. Gene symbol: *CRB1*. Hum Genet. 2007a Feb;120(6):914.
- Vallespin E, Riveiro-Alvarez R, Aguirre-Lamban J, Cantalapiedra D, Tapias I, Garcia-Sandoval B, Trujillo-Tiebas MJ, Ayuso C. Gene symbol: *CRB1*. Disease: early onset retinitis pigmentosa. Hum Genet. 2006d Jul;119(6):681.
- Vallespin E, Riveiro-Alvarez R, Cantalapiedra D, Aguirre-Lamban J, Avila-Fernandez A, Lopez-Martinez MA, Gallego-Merlo J, Trujillo-Tiebas MJ, Ayuso C. Gene symbol: *CRB1*. Hum Genet. 2007b Apr;121(2):287-8.
- van de Pavert SA, Kantardzhieva A, Malysheva A, Meuleman J, Versteeg I, Levelt C, Klooster J, Geiger S, Seeliger MW, Rashbass P, Le Bivic A, Wijnholds J. Crumbs homologue 1 is required for maintenance of photoreceptor cell polarization and adhesion during light exposure. J Cell Sci. 2004 Aug 15;117(Pt 18):4169-77.
- van de Pavert SA, Sanz AS, Aartsen WM, Vos RM, Versteeg I, Beck SC, Klooster J, Seeliger MW, Wijnholds J. *CRB1* is a determinant of retinal apical Müller glia cell features. Glia. 2007 Nov 1;55(14):1486-97.
- van der Spuy J, Chapple JP, Clark BJ, Luthert PJ, Sethi CS, Cheetham ME. The Leber congenital amaurosis gene product *AIPL1* is localized exclusively in rod photoreceptors of the adult human retina. Hum Mol Genet. 2002 Apr 1;11(7):823-31.
- van der Spuy J, Kim JH, Yu YS, Szel A, Luthert PJ, Clark BJ, Cheetham ME. The expression of the Leber congenital amaurosis protein *AIPL1* coincides with rod and cone photoreceptor development. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003 Dec;44(12):5396-403.

van Soest S, Ingeborgh van den Born L, Gal A, Farrar GJ, Bleeker-Wagemakers LM, Westerveld A, Humphries P, Sandkuijl LA, Bergen AA. Assignment of a gene for autosomal recessive retinitis pigmentosa (RP12) to chromosome 1q31-q32.1 in an inbred and genetically heterogeneous disease population. *Genomics*. 1994 Aug;22(3):499-504.

VV.AA. Un camino para todos. Guía del camino de santiago para personas con discapacidad. Guía para la reflexión. Guía de recursos. Ibermutuamur. Madrid. 2004.

W

Waardenburg PJ, Schappert-Kimmijser J. On various recessive biotypes of Leber's congenital amaurosis. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1963;41:317-20.

Wang QL, Chen S, Esumi N, Swain PK, Haines HS, Peng G, Melia BM, McIntosh I, Heckenlively JR, Jacobson SG, Stone EM, Swaroop A, Zack DJ. *QRX*, a novel homeobox gene, modulates photoreceptor gene expression. *Hum Mol Genet*. 2004 May 15;13(10):1025-40.

Wang P, Guo X, Zhang Q. Further evidence of autosomal-dominant Leber congenital amaurosis caused by heterozygous *CRX* mutation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2007 Sep;245(9):1401-2.

Williams ML, Coleman JE, Haire SE, Aleman TS, Cideciyan AV, Sokal I, Palczewski K, Jacobson SG, Semple-Rowland SL. Lentiviral expression of retinal guanylate cyclase-1 (*RetGC1*) restores vision in an avian model of childhood blindness. *PLoS Med*. 2006 Jun;3(6):e201.

Wodarz A, Hinz U, Engelbert M, Knust E. Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of *Drosophila*. *Cell*. 1995 Jul 14;82(1):67-76.

Y

Yau KW. Phototransduction mechanism in retinal rods and cones. The Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994 Jan;35(1):9-32.

Yoshida S, Yamaji Y, Yoshida A, Kuwahara R, Yamamoto K, Kubata T, Ishibashi T. Novel triple missense mutations of *GUCY2D* gene in Japanese family with cone-rod dystrophy: possible use of genotyping microarray. *Mol Vis*. 2006 Dec 6;12:1558-64.

Yzer S, Leroy BP, De Baere E, de Ravel TJ, Zonneveld MN, Voeselek K, Kellner U, Ciriano JP, de Faber JT, Rohrschneider K, Roepman R, den Hollander AI, Cruysberg JR, Meire F, Casteels I, van Moll-Ramirez NG, Allikmets R, van den Born LI, Cremers FP. Microarray-based mutation detection and phenotypic characterization of patients with Leber congenital amaurosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006 Mar;47(3):1167-76.

Z

Zernant J, Klm M, Dharmaraj S, den Hollander AI, Perrault I, Preising MN, Lorenz B, Kaplan J, Cremers FP, Maumenee I, Koenekoop RK, Allikmets R. Genotyping microarray (disease chip) for Leber congenital amaurosis: detection of modifier alleles. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005 Sep;46(9):3052-9.

Zhao Y, Hong DH, Pawlyk B, Yue G, Adamian M, Grynberg M, Godzik A, Li T. The retinitis pigmentosa GTPase regulator (*RPGR*)- interacting protein: subserving *RPGR* function and participating in disk morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 1;100(7):3965-70.



“Gallegas en la ventana”
Bartolomé Esteban Murillo, 1670

PUBLICACIONES DERIVADAS
DE ESTE TRABAJO

8. Publicaciones derivadas de este trabajo

- § **Vallespin E**, Cantalapiedra D, Riveiro-Alvarez R, Wilke R, Aguirre-Lamban J, Avila-Fernandez A, Lopez-Martinez MA, Gimenez A, Trujillo-Tiebas MJ, Ramos C, Ayuso C. Mutation screening of 299 Spanish families with retinal dystrophies by Leber congenital amaurosis genotyping microarray. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007 Dec;48(12):5653-61.
- § **Vallespin E**, Lopez-Martinez MA, Cantalapiedra D, Riveiro-Alvarez R, Aguirre-Lamban J, Avila-Fernandez A, Villaverde C, Trujillo-Tiebas MJ, Ayuso C. Frequency of CEP290 c.2991_1655A>G mutation in 175 Spanish families affected with Leber congenital amaurosis and early-onset retinitis pigmentosa. *Mol Vis*. 2007 Nov 27;13:2160-2.
- § Riveiro-Alvarez R*, **Vallespin E***, Wilke R, Garcia-Sandoval B, Cantalapiedra D, Aguirre-Lamban J, Avila A, Gimenez A, Trujillo-Tiebas MJ, Ayuso C. **These two authors contributed equally to this publication.* Molecular analysis of *ABCA4* and *CRB1* genes in one mixed Spanish family segregating Stargardt disease and Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa. *Mol. Vis*. 2007. *Pendiente de paginación.*
- § **Vallespin E**, Cantalapiedra D, Garcia-Hoyos M, Riveiro R, Villaverde C, Trujillo-Tiebas MJ, Ayuso C. Gene symbol: *CRB1*. Disease: Leber congenital amaurosis. *Hum Genet*. 2006 Feb;118(6):777.
- § **Vallespin E**, Cantalapiedra D, Garcia-Hoyos M, Riveiro R, Villaverde C, Trujillo-Tiebas MJ, Ayuso C. Gene symbol: *CRB1*. Disease: Leber congenital amaurosis. *Hum Genet*. 2006 Feb;118(6):774.
- § **Vallespin E**, Cantalapiedra D, Garcia-Hoyos M, Riveiro R, Queipo A, Trujillo-Tiebas MJ, Ayuso C. Gene symbol: *CRB1*. Disease: Leber congenital amaurosis. *Hum Genet*. 2006 Feb;118(6):778.
- § **Vallespin E**, Riveiro-Alvarez R, Aguirre-Lamban J, Cantalapiedra D, Tapias I, Garcia-Sandoval B, Trujillo-Tiebas MJ, Ayuso C. Gene symbol: *CRB1*. Disease: early onset retinitis pigmentosa. *Hum Genet*. 2006d Jul;119(6):681.

- § **Vallespin E**, Millan JM, Riveiro-Alvarez R, Aguirre-Lamban J, Cantalapiedra D, Gallego J, Trujillo-Tiebas MJ, Ayuso C. Gene symbol: *CRB1*. Hum Genet. 2007 Feb;120(6):914.
- § **Vallespin E**, Riveiro-Alvarez R, Cantalapiedra D, Aguirre-Lamban J, Avila-Fernandez A, Lopez-Martinez MA, Gallego-Merlo J, Trujillo-Tiebas MJ, Ayuso C. Gene symbol: *CRB1*. Hum Genet. 2007b Apr;121(2):287-8.
- § **Vallespin E**, Riveiro-Alvarez R, Cantalapiedra D, Aguirre-Lamban J, Avila-Fernandez A, Lopez-Gimenez-Pardo A, Trujillo-Tiebas MJ, Ayuso C. Gene symbol: *CRB1*. Hum Genet. 2007 Apr;121(2):297-8.
- § Avila-Fernandez A, Riveiro-Alvarez R, **Vallespin E**, Wilke R, Tapias I, Cantalapiedra D, Aguirre-Lamban J, Gimenez A, Trujillo-Tiebas MJ, Ayuso C. Genotype-phenotype correlation in seven CERKL mutated Spanish families with Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007. *Pendiente de paginación*.
- § Avila-Fernandez A, **Vallespin E**, Cantalapiedra D, Riveiro-Alvarez R, Gimenez A, Trujillo-Tiebas MJ, Ayuso C. Gene symbol: *GUCY2D*. Disease: early onset retinitis pigmentosa. Hum Genet. 2007 Jun;121(5):650-1.



Toledo
S. Cheli, 2007

9. ANEXOS

ANEXO I

Consentimiento informado pacientes

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO GENÉTICO DE DISTROFIAS DE RETINA

HOJA DE INFORMACIÓN PARA PARTICIPAR EN INVESTIGACION

Proyecto: Distrofias de Retina (DR) y Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE)

Investigador Principal: Carmen AYUSO

Servicio de Genética

Fundación Jiménez Díaz. MADRID

Tfno: 91 550 48 72

Por favor, lea con atención este documento y formule las preguntas que quiera.

INTRODUCCIÓN

Las distrofias de Retina (DR) son una causa genética de ceguera y discapacidad. En el momento actual se dispone del conocimiento obtenido del proyecto genoma humano, y existe un gran desarrollo de la biotecnología. Por ello, el estudio de las causas de estos procesos permitirá una prevención, diagnóstico y tratamiento más eficaces, con el objetivo final de disminuir la frecuencia y la gravedad de estas enfermedades.

OBJETIVOS

Nuestro equipo pertenece a un grupo de investigación internacional (EVI-Genoret; <http://www.evi-genoret.org>) para el estudio de las enfermedades de la retina: DR y DMAE. Su objetivo es obtener nuevos conocimientos para resolver los problemas médicos de estas enfermedades (prevención, diagnóstico y tratamiento).

En el Servicio de Genética de la Fundación Jiménez Díaz estamos realizando la investigación arriba mencionada, para conocer mejor el posible papel de los genes relacionados con su enfermedad.

La participación en este proyecto es voluntaria y no supone ningún riesgo para usted. Su colaboración puede ayudar a mejorar el conocimiento sobre esta enfermedad.

CONSIDERACIONES ÉTICAS:

La confidencialidad de los datos personales y genéticos obtenidos estará asegurada, respetando en todo momento los principios éticos básicos de la investigación con muestras biológicas, y lo establecido por la legislación aplicable y por las regulaciones vigentes en materia de protección de datos de carácter personal. (Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre, de Protección de Datos, Ley 41/2002 de Autonomía del Paciente y Sanitaria y Ley 14/1986, General de Sanidad y otras) y Ley 14/2007 de investigación biomédica.

Teniendo en cuenta que el estudio utiliza muestras para estudio de genes, se respetarán los principios de la Declaración de Helsinki y los contenidos en la Declaración Universal de la UNESCO referentes al genoma humano.

Así como la ratificación del Convenio para la Protección de los Derechos Humanos y la dignidad del ser humano con respecto a las aplicaciones de la Biología y la Medicina (Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina), hecho en Oviedo el 4 de abril de 1997 (BOE n. 251 de 20/10/1999).

Todos los datos clínicos que puedan revelar su identidad, se procesarán en la más estricta confidencialidad.

DESCRIPCIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS

Vd. y/o su familiar padecen DR, una enfermedad con un componente genético. Vd. o su médico han solicitado un procedimiento de diagnóstico y consejo genéticos para ayudar la evaluación clínica de dicha enfermedad.

Vd. no va a ser sometido a ningún procedimiento extraordinario distinto del proceso diagnóstico habitual, excepto para los familiares la extracción de una pequeña muestra biológica (5 cc de sangre o células bucales).

En su caso se realizará el análisis de algunos genes relacionados con la DR.

¿EN QUÉ CONSISTIRÁ SU PARTICIPACIÓN?

En el presente estudio le pedimos su colaboración en los siguientes aspectos:

- A)** Una consulta para recoger sus antecedentes personales y familiares
- B)** Extracción de una muestra de sangre venosa de unos 5 ml o de un cepillado del interior de la mejilla (mucosa oral).

MUESTRAS BIOLÓGICAS

A partir de las muestras biológicas, se extraerá el ADN y/o ARN (Ácido Ribo Nucléico) o se cultivarán los linfocitos (células existentes en la sangre):

- 1.- Una pequeña muestra de dicho ADN se utilizará para el análisis de los genes en estudio, relacionadas con las DR.
- 2.- Es probable que en un futuro se descubran más genes que puedan estar también involucrados en el desarrollo de estas u otras enfermedades.

Por ello se le solicita que autorice al Investigador a almacenar su muestra para el estudio de otros genes que se puedan descubrir en el futuro. Si Vd. acepta autorizar este almacenamiento, se realizará una codificación de la muestra antes de guardarla en nuestro banco de DNA (DNAteca), durante un periodo de hasta 15 años.

Vd. debe otorgar su consentimiento informado por escrito, indicando qué parte del estudio genético acepta y firmando este documento, antes de la obtención del ADN.

Si Vd. acepta sólo los estudios genéticos descritos en el punto 1, su muestra se destruirá después de completar la prueba.

Una vez concluida dicha investigación (fases 1 y 2), si aún quedase muestra, ésta será destruida o se retirará el vínculo que liga su muestra de ADN con su identificación (anonimización). Una vez se haya destruido este vínculo, no será posible encontrar su muestra y por tanto no podrá ser destruida.

FUENTE DE FINANCIACIÓN

El presente proyecto está financiado con fondos del Ministerio de Sanidad español (ISCIII) y de la Unión Europea. (Evi-Genoret Integrated Project LSHG-CT-2005-512036).

Ni los investigadores ni los participantes en el estudio percibirán remuneración económica alguna por su participación.

BENEFICIOS QUE SE ESPERAN ALCANZAR

Los resultados de dichos estudios contribuirán de forma global a conocer la causa de esta enfermedad, a mejorar la información a las familias afectadas y a posibilitar el diagnóstico y tratamiento precoces.

Tiene Vd derecho a conocer los resultados genéticos individuales y/o generales confirmados que se obtengan a partir del análisis de las muestras donadas y las repercusiones clínicas conocidas que ello conlleva.

RIESGOS

Es posible que se obtenga información relativa a su salud, derivada de los análisis genéticos que se realicen sobre su muestra biológica.

En ese caso se le entregaría un informe genético específico, explicándole la implicación clínica que tiene la alteración genética identificada, en una consulta especial llamada de “consejo genético”.

Vd debe advertir a los investigadores en caso de NO QUERER ser informado.

Además la información que se pudiera obtener podría tener implicaciones para sus familiares, y en ese caso seria conveniente que Vd. mismo les transmita dicha información.

CONFIDENCIALIDAD Y DERECHOS DE ACCESO Y RECTIFICACIÓN

Toda la información (clínica, genética, etc.) será recogida y tratada de forma confidencial por todo el personal. Únicamente el número de identificación permitirá a los investigadores responsables de la Fundación Jiménez Díaz hacer corresponder las muestras biológicas y los datos con las personas participantes. Las muestras serán almacenadas de forma adecuada, durante el tiempo que dure la investigación.

Estos datos formarán parte de un fichero automatizado y/o manual cuya finalidad es la de gestionar su historia clínica y que estará ubicado en la Fundación Jiménez Díaz. El responsable del fichero es la Dirección Médica de la Fundación Jiménez Díaz con domicilio en la Avda/ Reyes Católicos nº 2 Madrid (28040), dónde podrá ejercitar los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición que en aplicación de la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos legalmente le asisten.

Ninguno de los datos personales será transferido. Únicamente algunos de los datos clínicos codificados y sin ninguna identificación personal serán introducidos en una base de datos europea de acceso restringido para los investigadores de EVI-GENORET (miembros de países de la UE, descritos en <http://www.evi-genoret.org/>).

Los resultados del estudio podrán ser comunicados en reuniones científicas, congresos médicos o publicaciones científicas, manteniendo una estricta confidencialidad sobre la identidad de los pacientes.

Su participación en este estudio es voluntaria. Vd. puede decidir no participar.

Asimismo, Vd. puede decidir retirarse del estudio, en cualquier momento, sin que ello afecte a su atención médica o de sus familiares. Si así ocurriera, ha de contactar con algún miembro del equipo investigador, e indicarle cuál es su decisión acerca del destino de sus muestras/datos personales.

Le comunicamos que su decisión, sea cual sea, no afectará a su atención médica o la de sus familiares.

Si deseara participar, conserve esta Hoja de Información al Paciente por si quisiera consultarla de nuevo en el futuro. Tal como exige la ley, para participar deberá firmar y fechar el documento de consentimiento informado anexo.

**CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO PARA ESTUDIO GENÉTICO DE
DISTROFIAS DE RETINA (DR) y DMAE**

Proyecto: Distrofias de Retina (DR) y Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE).

Investigador Principal: Carmen AYUSO

Servicio de Genética
Fundación Jiménez Díaz. MADRID
tfno: 91/ 5504872

Persona que proporciona la información y la hoja de consentimiento

Nombre:

Fecha:

Yo, (nombre y apellidos)

Declaro bajo mi responsabilidad que

- He leído la Hoja de Información que se me ha entregado sobre el estudio genético y que se me han explicado las características y el objetivo del estudio genético y los posibles beneficios y riesgos que puedo esperar y acepto participar en él.
- Se me ha entregado una copia de la Hoja de Información al Participante y una copia de este consentimiento informado, fechado y firmado.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- He recibido suficiente información sobre el estudio y la he comprendido.
- Comprendo que mi participación es voluntaria.
- Comprendo que puedo retirarme del estudio:
 - 1) Cuando quiera.
 - 2) Sin tener que dar explicaciones.
 - 3) Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

- Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio:

Punto 1.- Yo DOY ☐ / No DOY ☐ mi consentimiento voluntariamente para que se pueda realizar los estudios genéticos en relación con las Distrofias de Retina en mi muestra de ADN.

Punto 2.- Yo DOY ☐ / No DOY ☐ mi consentimiento voluntariamente para que se guarde mi muestra de ADN. Esto permitirá la realización de nuevas pruebas en el futuro cuando se tengan más conocimientos sobre los genes relacionados con las Distrofias de Retina.

Punto 3.- Yo DOY ☐ / No DOY ☐ mi consentimiento voluntariamente para que mis datos clínicos sean introducidos en la base de datos europea de acceso restringido para los investigadores de EVI-GENORET y colaboradores.

Consiento en participar voluntariamente en los apartados marcados de este estudio genético.

Firma del participante

Firma del investigador

**Firma del representante legal
(Para menores o incapacitados)**

ANEXO II
Consentimiento informado
donantes voluntarios

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONAR MUESTRA CONTROL PARA ESTUDIOS DE ADN

Por favor, lea con atención este documento y formule las preguntas que quiera

OBJETIVOS

Nuestro equipo pertenece a un grupo de investigación internacional para el estudio de las enfermedades genéticas. Su objetivo es obtener nuevos conocimientos para resolver los problemas médicos de estas enfermedades (prevención, diagnóstico y tratamiento). En el Servicio de Genética de la Fundación Jiménez Díaz estamos realizando la investigación arriba mencionada, para conocer mejor el posible papel de los genes relacionados con las enfermedades. La participación en este proyecto es voluntaria y no supone ningún riesgo para usted. Su colaboración puede ayudar a mejorar el conocimiento sobre estas enfermedades.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

La confidencialidad de los datos personales y genéticos obtenidos estará asegurada, respetando en todo momento los principios éticos básicos de la investigación con muestras biológicas, y lo establecido por la legislación aplicable (Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre, de Protección de Datos, Ley 41/2002 de Autonomía del Paciente y Sanitaria y Ley 14/1986, General de Sanidad. Teniendo en cuenta que el estudio utiliza muestras para estudio de genes, se respetarán los principios de la Declaración de Helsinki y los contenidos en la Declaración Universal de la UNESCO referentes al genoma humano. Usted es donante de sangre, en su caso se procederá a poner un código numérico sin ningún dato personal (proceso de anonimización) inmediatamente después de tomar su muestra.

¿EN QUÉ CONSISTIRÁ SU PARTICIPACIÓN?

En el presente estudio le pedimos su colaboración en los siguientes aspectos:

1. Extracción de una muestra de sangre periférica de unos 5cc.

BENEFICIOS QUE SE ESPERAN ALCANZAR

Los resultados de dichos estudios contribuirán de forma global a conocer la causa de estas enfermedades, a mejorar la información a las familias afectadas y a posibilitar el diagnóstico y tratamiento precoces.

CONFIDENCIALIDAD Y DERECHOS DE ACCESO Y RECTIFICACIÓN

Toda la información será recogida y tratada de forma confidencial por todo el personal. **Proceso de anonimización: Su muestra no contendrá ningún dato que permita identificar ni relacionar su muestra con los resultados. No es posible para nadie hacer corresponder las muestras biológicas y los datos con las personas participantes. Por ello y en consecuencia es imposible obtener ningún resultado que pueda ser entregado.**

Dichas muestras serán almacenadas de forma adecuada, durante el tiempo que dure la investigación.

Yo, (nombre y apellidos) _____

- Declaro bajo mi responsabilidad que he leído la Hoja de Información que se me ha entregado sobre el estudio genético y que se me han explicado las características y el objetivo del estudio genético y los posibles beneficios y riesgos que puedo esperar y acepto participar en él.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio
- He recibido suficiente información sobre el estudio y la he comprendido
- He hablado con: (nombre del investigador)

Punto 1.- Yo DOY ☐ / No DOY ☐ mi consentimiento voluntariamente para que se puedan realizar estudios genéticos en mi muestra de ADN anonimizada.

Consiento en participar voluntariamente en el apartado marcado de este estudio.

Firma del investigador

Firma del paciente

